Etude comparée et saisonnière de l'influence de deux champignons mycorhiziens sur la nutrition minérale du hêtre dans deux sols forestiers naturels

Patricia Genet

▶ **To cite this version:**

Patricia Genet. Etude comparée et saisonnière de l'influence de deux champignons mycorhiziens sur la nutrition minérale du hêtre dans deux sols forestiers naturels. Sylviculture, foresterie. Université Henri Poincaré - Nancy 1, 1999. Français. NNT : 1999NAN10296 . tel-01747410

HAL Id: tel-01747410
https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01747410

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

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.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm

U.F.R. Sciences et Techniques Biologiques
Ecole Doctorale Biologie et Santé
D.F.D. Biologie Végétale & Forestière

THESE

Présentée pour l'obtention du titre de

Docteur de l'Université Henri Poincaré, Nancy I

Spécialité : *Biologie Végétale et Forestière*

Par

Patricia GENET

S.C.D. - U.H.P. NANCY 1 SCIENCES BIBLIOTHÈQUE

ETUDE COMPAREE ET SAISONNIERE DE L'INFLUENCE DE DEUX CHAMPIGNONS MYCORHIZIENS SUR LA NUTRITION MINERALE DU HETRE DANS DEUX SOLS FORESTIERS NATURELS.

Soutenue publiquement le 12 mars 1999.

Membres du jury :

Président	:	M. J. DEXHEIMER, Professeur, Université Henri Poincaré, Nancy I
Rapporteurs	:	Mme I. KOTTKE, Directeur de Recherches, Université Tübingen, Allemagne
		M. D. MOUSAIN, Directeur de Recherches, INRA, Montpellier
Examinateurs	:	M. F. TOUTAIN, Professeur émérite, CNRS, Nancy I
		Mme G. VILLEMIN, Ingénieur de Recherches, CNRS, Nancy I
Directeur de thèse	:	M. J.C. PARGNEY, Maître de Conférence, Université Henri Poincaré, Nancy I

Laboratoire de Biologie Forestière – Faculté des Sciences – 54 500 Vandoeuvre - lès - Nancy

Je tiens tout particulièrement à remercier Monsieur le Professeur Dexheimer pour m'avoir accueillie dans son équipe de Cytophysiologie des Symbioses Mycorhiziennes du Laboratoire de Biologie Forestière ainsi que pour sa gentillesse et sa grande disponibilité quand le besoin s'en faisait sentir.

Ce travail a été réalisé sous la direction de Monsieur Pargney, Maître de Conférences à l'Université Henri Poincaré-Nancy I. Il m'a encadrée tout au long de cette thèse et je tiens à lui faire part de ma reconnaissance pour ses conseils, sa disponibilité de tout instant et sa bonne humeur.

Je remercie vivement les membres du jury Madame Kottke, Monsieur Mousain, Madame Villemin, Monsieur Toutain, Monsieur Dexheimer et Monsieur Pargney d'avoir bien voulu juger ce travail.

Je tiens également à remercier Monsieur Toutain, Madame Villemin et Françoise Watteau qui m'ont permis de découvrir le monde de la Pédologie. Les sorties sur le terrain en leur compagnie ont été autant plaisantes qu'instructives.

Les observations et les microanalyses ont été réalisées dans les Services Communs de Microscopie Electronique du Professeur Dexheimer et du Professeur Billaud. Un grand merci à Jaafar Ghanbaja qui, avec beaucoup de patience, de gentillesse et de bonne humeur m'a initiée à la microanalyse. Ce fut un réel plaisir de travailler en sa compagnie.

Les analyses des phosphates des deux sols ont été réalisées au Centre de Pédologie Biologique avec messieurs Rouiller et Merlet que je remercie vivement pour leur disponibilité et leur compétence.

Enfin, je tiens à remercier tous ceux qui m'ont soutenu tout au long de ces quelques années. Isabel, Carole, merci à toutes les deux pour vos encouragements, votre bonne humeur, vous êtes pour beaucoup dans la réalisation de ce travail. Je n'oublie pas Patrick, Mae, Guy, Bertrand, Mamita, Delphine et Valérie la Blonde, Badr, Laurence, Sophie, Anne-Marie, Jean François, Marie-Noëlle, Valérie, Rédoine, Jacques et Joëlle, qui à un moment ou à un autre ont été présents. Merci également à tous les autres que je ne peux malheureusement pas citer.

Je dédie cette thèse à mes parents et à mes frères et sœur, dont la patience a souvent été mise à rude épreuve.

Merci à vous enfin, qui lirez ces pages....

a : amyloplaste
A : Ascomycète
c : ciment
C : cortex
Ca : cambium
cc : cellule corticale
Cc : cylindre central
Cy : cytoplasme
dp : dolipore
e : endoderme
ep : épaississement pariétal
gl : glycogène
h : hyphe
he : hyphe extramatricielle
hi : hyphe intracellulaire
j : jonctions cellulaires
L : laticifère
M : manteau
Me : manteau externe
mé : méristème
Mi : manteau interne
mi : mitochondrie
mu : mucilage
my : mycorhize
p : parenchyme médullaire
pf : paroi fongique
ph : phellogène
Phl : phloème
pv : paroi végétale
px : paroi xylémienne
RE : réticulum endoplasmique
RH : réseau de Hartig
rpm : racine porteuse de mycorhizes
rpr : racine porteuse de ramifications
S : suber
Sc : sclérote
T : composés polyphénoliques
v : vacuole
w : corps de Woronin
x : xylème

INTRODUCTION GENERALE *1*

SITES, MATERIELS ET METHODES *24*

I. MATERIELS BIOLOGIQUES ET SITES ETUDIES 24
A. Le partenaire végétal 24
B. Les hêtraies sur deux sols différents 24
1. Le Hêtre sur la rendzine brunifiée : le site de la Crédence 24
2. Le Hêtre sur le sol podzolique : le site de Bezange 25
C. Les champignons mycorhiziens 26
1. Les mycorhizes de *Cenococcum geophilum* L. 26
2. Les mycorhizes de *Lactarius subdulcis* Fr., ss. Q., Lange 26

II. PRELEVEMENTS DES ECHANTILLONS BIOLOGIQUES 26

III. MESURE DU pH(eau) DU SOL 27

IV. DOSAGE DES ELEMENTS TOTAUX, DES PHOSPHATES SOLUBLES ET ECHANGEABLES 27
A. Les éléments totaux 28
B. Les phosphates solubles et échangeables 28

V. PREPARATION DES ECHANTILLONS BIOLOGIQUES 28
A. Fixation chimique 29
B. Déshydratation, imprégnation et inclusion 29
C. Réalisation des coupes 30
D. Observations en microscopie photonique 30
E. Observations en microscopie électronique à transmission 31
1. Etude ultrastructurale 31
a. Observation ultrastructurale 31
b. Traitement des coupes 31
2. Etude cytochimique 32
a. Marquage des polysaccharides par le test PATAg 32
b. Mise en évidence des protéines riches en cystine par la technique de Swift ... 32
F. Techniques de microanalyses 33
1. Spectroscopie par pertes d'énergie des électrons transmis (EELS) 34
2. Microanalyse des rayons X (EDXS) 35
3. Analyse par imagerie filtrée (cartographie X) 35

CHAPITRE I : CARACTERISATION DES MODELES MYCORHIZIENS ET DE LEURS RACINES PORTEUSES PENDANT LA PERIODE ESTIVALE SUR LA RENDZINE BRUNIFIEE.

INTRODUCTION **36**

RESULTATS **39**
I. ETUDE MORPHOLOGIQUE 39
A. Les mycorhizes de *Cenococcum geophilum* 39
B. Les mycorhizes de *Lactarius subdulcis* 39
C. Les racines porteuses de mycorhizes 40

II. ETUDE HISTOLOGIQUE 40
A. Les mycorhizes de *Cenococcum geophilum* 40
B. Les mycorhizes de *Lactarius subdulcis* 40
C. Les racines porteuses de mycorhizes 41

III. ETUDE ULTRASTRUCTURALE 41
A. Les mycorhizes de *Cenococcum geophilum* 42
B. Les mycorhizes de *Lactarius subdulcis* 42
C. Les racines porteuses de mycorhizes 43

IV. ETUDE CYTOCHIMIQUE 44
A. Les mycorhizes de *Cenococcum geophilum* 44
1. Le test PATAg 44
2. Le marquage de Gomori-Swift 45
B. Les mycorhizes de *Lactarius subdulcis* 46
1. Le test PATAg 46
2. Le marquage de Gomori-Swift 46
C. Les racines porteuses de mycorhizes 47
1. Le test PATAg 47
2. Le marquage de Gomori-Swift 47

V. ETUDE MICROANALYTIQUE 48
A. Les mycorhizes de *Cenococcum geophilum* 48
1. La surface des mycorhizes 48
2. Le manteau 48
3. Le réseau de Hartig 48
4. Le cortex profond 49
5. Le cylindre central 49
B. Les mycorhizes de *Lactarius subdulcis* 49
1. La surface des mycorhizes 50
2. Le manteau 50
3. Le réseau de Hartig 50
4. Le cortex profond 50
5. Le cylindre central 51
C. Les racines porteuses de mycorhizes 51
1. Le cortex 51
2. Le cylindre central 51

DISCUSSION **52**

CONCLUSION **63**

PLANCHES

CHAPITRE II : LES COUPLES MYCORHIZIENS ET LEURS RACINES PORTEUSES PENDANT LA PERIODE ESTIVALE SUR LE SOL PODZOLIQUE.

INTRODUCTION **65**

RESULTATS **67**
I. ETUDE MORPHOLOGIQUE 67
A. Les mycorhizes de *Cenococcum geophilum* 67
B. Les mycorhizes de *Lactarius subdulcis* 67
C. Les racines porteuses de mycorhizes 68

II. ETUDE HISTOLOGIQUE 68
A. Les mycorhizes de *Cenococcum geophilum* 68
B. Les mycorhizes de *Lactarius subdulcis* 68
C. Les racines porteuses de mycorhizes 68

III. ETUDE ULTRASTRUCTURALE 69
A. Les mycorhizes de *Cenococcum geophilum* 69
B. Les mycorhizes de *Lactarius subdulcis* 69
C. Les racines porteuses de mycorhizes 70

IV. ETUDE CYTOCHIMIQUE 70
A. Les mycorhizes de *Cenococcum geophilum* 70
1. Le test PATAg 70
2. Le marquage de Gomori-Swift 71
B. Les mycorhizes de *Lactarius subdulcis* 72
1. Le test PATAg 72
2. Le marquage de Gomori-Swift 72

C. Les racines porteuses de mycorhizes 73
1. Le test PATAg 73
2. Le marquage de Gomori-Swift 73

V. ETUDE MICROANALYTIQUE 74
A. Les mycorhizes de *Cenococcum geophilum* 74
1. La surface des mycorhizes 74
2. Le manteau 74
3. Le réseau de Hartig 74
4. Le cortex profond 75
5. Le cylindre central 75
B. Les mycorhizes de *Lactarius subdulcis* 75
1. La surface des mycorhizes 75
2. Le manteau 75
3. Le réseau de Hartig 76
4. Le cortex profond 76
5. Le cylindre central 76
C. Les racines porteuses de mycorhizes 77
1. Le cortex 77
2. Le cylindre central 77

DISCUSSION **78**

CONCLUSION **88**

PLANCHES

CHAPITRE III : EVOLUTION SAISONNIERE DES MODELES MYCORHIZIENS ET DE LEURS RACINES PORTEUSES.

INTRODUCTION **90**

RESULTATS **92**

Chapitre III.1 : SUR LA RENDZINE BRUNIFIEE **92**

I. LES MYCORHIZES DE *CENOCOCCUM GEOPHILUM* 92
A. Etudes morphologique et histologique 92
B. Etude ultrastructurale 92
C. Etude cytochimique 93
1. Le test PATAg 93
2. Le marquage de Gomori-Swift 94
D. Etude analytique 95
1. La surface des mycorhizes 95
2. Le manteau 95
3. Le réseau de Hartig 96
4. Le cortex profond 97
5. Le cylindre central 97

II. LES MYCORHIZES DE *LACTARIUS SUBDULCIS* 98
A. Etudes morphologique et histologique 98
B. Etude ultrastructurale 98
C. Etude cytochimique 99
1. Le test PATAg 99
2. Le marquage de Gomori-Swift 100
D. Etude analytique 100
1. La surface des mycorhizes 100
2. Le manteau 101
3. Le réseau de Hartig 101
4. Le cortex profond 102
5. Le cylindre central 102

III. LES RACINES PORTEUSES DE MYCORHIZES DE *FAGUS SYLVATICA* 103
A. Etudes morphologique et histologique 103
B. Etude ultrastructurale 103
C. Etude cytochimique 104
1. Le test PATAg 104
2. Le marquage de Gomori-Swift 104
D. Etude analytique 105
1. Le cortex 105
2. Le cylindre central 106

Chapitre III.2 : SUR LE SOL PODZOLIQUE **107**

I. LES MYCORHIZES DE *CENOCOCCUM GEOPHILUM* 107
A. Etudes morphologique et histologique 107
B. Etude ultrastructurale 107
C. Etude cytochimique 108
1. Le test PATAg 108
2. Le marquage de Gomori-Swift 109
D. Etude analytique 110
1. La surface des mycorhizes 110
2. Le manteau 110
3. Le réseau de Hartig et les hyphes intracellulaires 111
4. Le cortex profond 111
5. Le cylindre central 112

II. LES MYCORHIZES DE *LACTARIUS SUBDULCIS* 113
A. Etudes morphologique et histologique 113
B. Etude ultrastructurale 113
C. Etude cytochimique 114
1. Le test PATAg 114
2. Le marquage de Gomori-Swift 114
D. Etude analytique 115
1. La surface des mycorhizes 115
2. Le manteau 115
3. Le réseau de Hartig 116
4. Le cortex profond 116
5. Le cylindre central 117

III. LES RACINES PORTEUSES DE MYCORHIZES DE *FAGUS SYLVATICA* 118
A. Etudes morphologique et histologique 118
B. Etude ultrastructurale 118
C. Etude cytochimique 118
1. Le test PATAg 118
2. Le marquage de Gomori-Swift 119
D. Etude analytique 119
1. Le cortex 119
2. Le cylindre central 120

DISCUSSION **122**

CONCLUSION **132**

PLANCHES

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES **134**

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES **137**

INTRODUCTION GENERALE

Les végétaux constituent un règne vivant très vaste colonisant pratiquement tous les milieux de la surface du globe terrestre. La végétation est ainsi un élément important d'un grand ensemble naturel : **l'écosystème**.

Au sein de celui-ci, des interrelations variées existent entre les organismes vivants (plantes et/ou animaux). En effet, des relations de prédations, des interactions de compétitions, de facilitations ont vu le jour, permettant aux différentes espèces de se contrôler mutuellement. De plus, ces différents organismes interagissent avec leur environnement et notamment **le sol** sur lequel ils se développent. En milieu naturel, les végétaux comme le sol sont soumis aux conditions climatiques qui constituent un autre aspect majeur de l'écosystème.

Si les organismes vivants influent sur leur environnement, l'inverse est également vrai puisque, outre un rôle de support des plantes, le sol assure l'approvisionnement en eau et en éléments minéraux nécessaires au développement de ces organismes et particulièrement à celui des plantes.

I. LE SOL : UNE RESERVE D'ELEMENTS MINERAUX

Le sol présente une position d'interface entre l'atmosphère, l'hydrosphère et la lithosphère. Il constitue une formation de surface, d'épaisseur variable, résultant de la transformation de la roche mère sous-jacente sous l'influence de divers processus physiques, chimiques et biologiques.

C'est un milieu complexe très hétérogène (Duchaufour, 1970 ; Callot et Jaillard, 1996) qui est constitué d'une phase solide (les agrégats de taille variable), d'une phase liquide (la solution du sol) dans laquelle circulent les éléments susceptibles d'être prélevés par les racines des végétaux et d'une phase gazeuse (l'atmosphère du sol).

A. CONSTITUTION DU SOL

1. La phase solide

Le sol comprend des éléments organiques en général minoritaires et des éléments minéraux, constituant le plus souvent la majeure partie de sa masse (Duchaufour, 1970).

a. La matière organique

La matière organique d'un sol ou **humus**, provient essentiellement des apports externes de la végétation (débris végétaux, feuilles, rameaux morts) et des pluviolessivats. Cet humus est

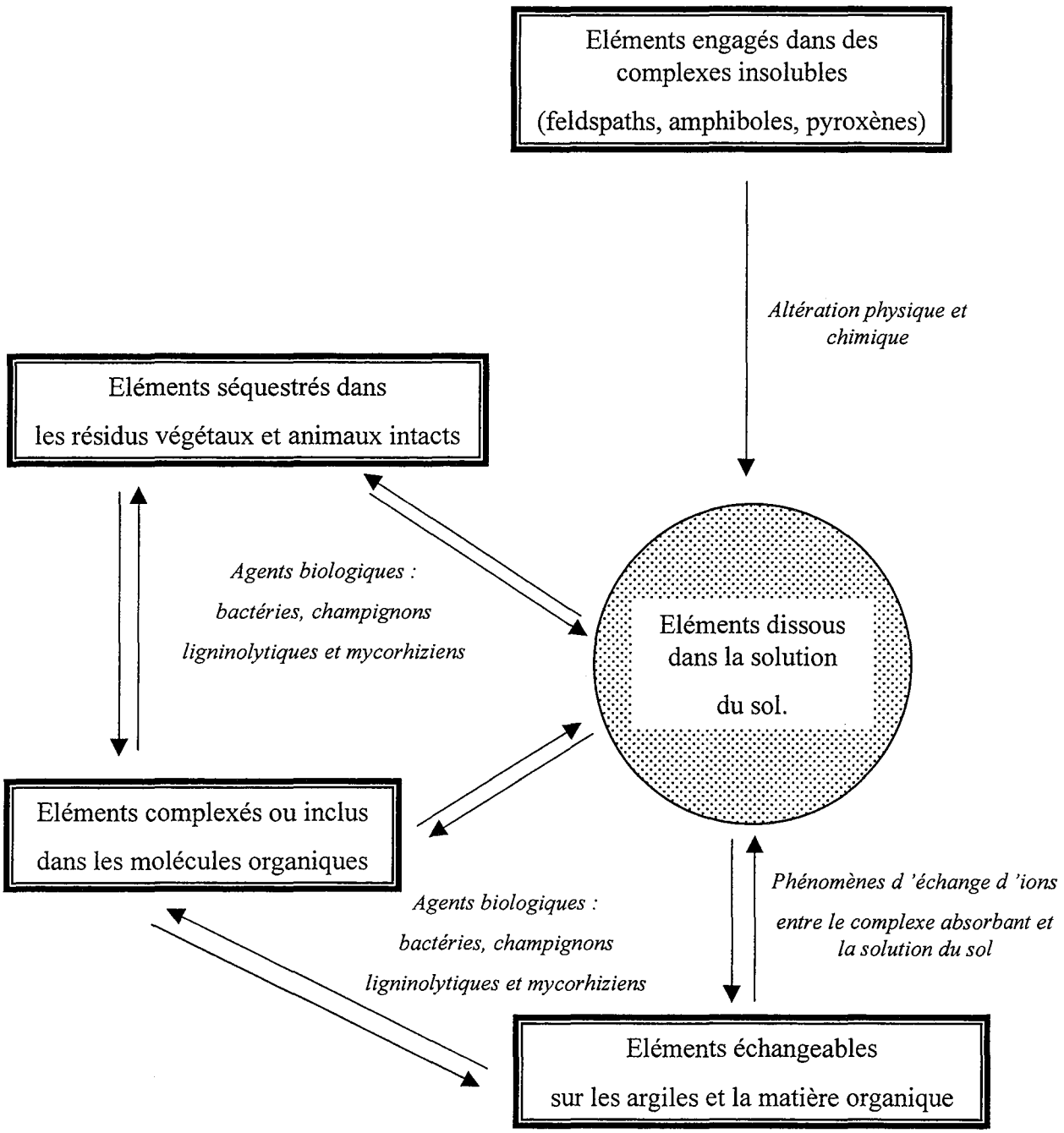


Figure 1 : Les différentes formes des éléments minéraux dans les sols.

progressivement dégradé en composés organiques plus simples sous l'action de différents processus chimiques et biologiques.

Deux processus chimiques principaux interviennent, successivement dans le temps, dans la dégradation de la matière organique. Dans un premier temps, l'**humification** conduit à une mise en réserve provisoire du carbone, sur et dans le sol, sous une forme plus ou moins complexe. Ces substances organiques partiellement dégradées sont ensuite minéralisées, ce qui aboutit à la libération dans le sol des éléments minéraux. La **minéralisation** de l'azote comprend deux étapes, l'ammonification (production d'ions ammonium) et la nitrification (libération d'ions nitrate). Ces différents processus sont assurés par différents agents biologiques.

b. Les éléments minéraux

Les éléments minéraux provenant de la dégradation de la matière organique peuvent être classés en quatre catégories (Duchaufour, 1970) (figure 1) :

- **les éléments dissous** dans la solution du sol tels que le bicarbonate de calcium, le nitrate de chaux, qui sont directement disponibles pour les racines des végétaux,

- **les éléments adsorbés sous forme échangeable**. Il s'agit d'anions (PO_4^{3-}) et de cations (Ca^{2+}, K^+, ...) généralement fixés dans le sol par les particules chargées négativement du sol : les **colloïdes** (argiles, humus). Ces ions peuvent être libérés dans la solution du sol, grâce à des phénomènes d'échanges d'ions,

- **les éléments absorbés sous forme non échangeable** ou fixés. Certains cations (Fe^{3+}) sont normalement absorbés par les argiles sous une forme peu ou pas échangeable.

Toutefois, des éléments absorbés sous forme échangeable peuvent être fixés plus fortement sur les colloïdes lorsqu'ils sont en faible quantité, devenant ainsi difficilement accessibles aux plantes,

- enfin **les éléments** engagés dans des combinaisons complexes qui sont totalement **insolubles** (feldspaths, amphiboles, pyroxènes).

2. La phase liquide

L'eau de la solution du sol est un facteur important puisqu'elle assure, d'une part les besoins hydriques des organismes vivants et d'autre part elle participe aux phénomènes d'hydrolyse conduisant à l'altération des minéraux.

Les mouvements d'eau dans le sol peuvent se produire dans deux directions distinctes :

- les mouvements ascendants, qui sont générés soit par l'absorption d'eau par les racines, soit par l'évapotranspiration au niveau des feuilles, soit par ces deux facteurs,

- et les mouvements descendants qui sont dus à la pesanteur.

3. La phase gazeuse

Elle est constituée de deux gaz principaux :

- l'oxygène atmosphérique qui est respiré par les organismes du sol. Ce gaz intervient également dans les processus d'oxydation,

- le gaz carbonique, déchet de la respiration des organismes vivants, est restitué dans l'atmosphère. L'activité respiratoire de la rhizosphère suit un cycle annuel. Elle est maximale lors de la reprise de végétation, et minimale au cours de la période hivernale.

B. CARACTERISTIQUES DU SOL

La nature d'un sol est définie par un certain nombre de valeurs caractéristiques qui renseignent notamment sur son fonctionnement :

1. Les caractéristiques physiques

Elles concernent la fraction solide du sol. Elles sont principalement au nombre de deux :

- la **texture** qui définit la proportion des différents constituants du sol (sables, limons, argiles),

- la **structure** qui résulte de l'agencement des éléments du sol (forme, taille, disposition des agrégats).

2. Les caractéristiques chimiques

Ces différents paramètres rendent compte de la dynamique du sol. Ils comprennent :

- **le complexe absorbant**. Celui-ci est formé par l'ensemble des argiles et des composés humiques, qui par leurs charges négatives, sont susceptibles de retenir à leur surface sous une forme échangeable certains ions de la solution du sol. Etant chargé négativement, le complexe fixe exclusivement les cations. Il convient de préciser toutefois qu'il existe également un complexe cationique fixant les anions,

- **la capacité d'échange cationique (CEC ou T)**. Cette valeur rend compte de la quantité maximale de cations qu'un poids déterminé de sol (100g) est capable de retenir,

- **la somme des bases échangeables (S)**. Elle indique la quantité de cations basiques (Ca^{2+}, Mg^{2+}, K^{+}...) échangeables fixés sur le complexe à un moment donné,

- **le taux de saturation en bases.** Il est défini par le rapport S / T et est exprimé en %,

- enfin, **le pH du sol.** Le pH correspond à la quantité de protons libres dans la solution du sol et indique donc le niveau d'acidité du substrat. Les protons qui sont chargés positivement, peuvent être fixés par les charges négatives du complexe absorbant au même titre que d'autres cations (Ca^{2+}, Al^{3+}, K^{+}, ...). Donc, plus l'acidité d'un sol est élevée (plus le pH est bas), plus le complexe absorbant du sol est occupé par les ions H^{+} et désaturé en autres cations (Ca^{2+}, Mg^{2+}, Na^{+},...) susceptibles d'augmenter le pH. Les variations du pH sont donc liées à des échanges de cations au niveau du complexe absorbant. Ces échanges assurent le pouvoir tampon du sol qui lui permet de s'opposer aux variations brutales de pH.

Les études portant sur les effets du pH d'un milieu, précisent généralement l'origine du substrat analysé. En effet, de par son hétérogénéité, le sol est constitué de nombreux microsites possédant leurs caractéristiques pédologiques propres, qui peuvent différer les unes des autres. En particulier, la distinction est faite entre le sol rhizosphérique, c'est-à-dire le sol au voisinage des racines, et le reste du sol, au niveau desquels le pH doit varier (Nye, 1981 ; Marschner *et al.*, 1982 ; Ortas *et al.*, 1994).

Ces différentes caractéristiques physiques et chimiques conditionnent le fonctionnement et donc l'évolution du sol. Diverses études ont ainsi montré que le pH influe considérablement sur la minéralisation des composés organiques. En effet, les pH acides ralentissent la dégradation de ces composés, ce qui tend à augmenter l'épaisseur de la couche humique et à inhiber la minéralisation de l'azote (Bonneau *et al.*, 1987 ; Robson et Abbott, 1989). De même, Gilmour (1984) a montré que la nitrification ne se produit pas pour des pH (eau) inférieurs à 4,1.

En fonction des conditions du milieu, les sols ont été répartis en différents groupes correspondant à une évolution plus ou moins rapide de la matière organique. Ainsi, les sols montrant une décomposition biologique rapide de la litière, sont généralement considérés comme des sols riches en éléments minéraux et l'humus est dit de type **mull**. A l'inverse, les sols, au niveau desquels la matière organique est dégradée plus lentement, sont classés parmi les sols pauvres et l'humus est de type **moder** voire de type **mor** lorsque la dégradation est extrêmement difficile.

II. LE SOL : UN HABITAT POUR LES ORGANISMES VIVANTS

Le sol constitue un biotope privilégié pour une grande variété d'êtres vivants. Ces organismes rassemblent la faune, la microflore du sol et les racines des végétaux. Ils sont présents en très grand nombre dans le sol et jouent un rôle prépondérant dans la dégradation de la

matière organique de manière directe et/ou indirecte (Pottier, 1986 ; Leyval et Berthelin, 1989 ; Dighton, 1991 ; Gulyas et Füleky, 1994 ; Zhu et Ehrenfeld, 1996).

1. La faune

La faune comprend essentiellement les Protozoaires, les Nématodes, les Arthropodes et les Lombrics.

En prospectant le sol (Klironomos et Kendrick, 1995), ces animaux font office de « laboureurs », améliorant de ce fait l'aération du sol et par conséquent l'activité microbienne. De plus, les composés organiques sont partiellement dégradés dans le tube digestif de certains animaux et sont rejetés ensuite dans les diverses couches du sol, assurant une meilleure distribution de la matière organique, ce qui induit également une stimulation de l'activité biologique.

2. La microcénose

Parmi la microcénose, nous pouvons citer les Bactéries, les Actinomycètes, les Champignons, les Algues et les Virus.

Après les Bactéries, les Champignons constituent un groupe de biodécomposeurs particulièrement efficaces puisqu'ils agissent directement sur la matière organique via des enzymes qui leur permettent d'avoir accès aux substances organiques complexes (Colpaert et van Tichelen, 1996).

La litière étant essentiellement constituée de débris végétaux, les composés les plus difficilement dégradables sont principalement représentés par la lignine et les celluloses. Tous les champignons ne possèdent pas les mêmes aptitudes à biodégrader ces substances et ce sont surtout les champignons de type pourriture qui sont responsables de cette biodégradation (Toutain, 1974 ; Sreng, 1977 ; Bending et Read, 1997). Ces champignons ligninolytiques appartiennent à différentes catégories, les plus nombreux étant les champignons de pourriture blanche. Ils possèdent notamment des activités cellulases, hémicellulases, peroxidases et laccases leur permettant d'accéder aux sources carbonées et énergétiques que sont les lignines, les celluloses et les hémicelluloses. Ces champignons ne sont en effet pas capables d'utiliser la lignine comme seule source de carbone (Hammel, 1997).

La plupart des champignons mycorhiziens ne sont pas aptes à dégrader la lignine comme les champignons ligninolytiques. Toutefois, les protéases et les phosphatases qu'ils produisent leur permettent d'assimiler des substances carbonées, azotées et phosphatées déjà partiellement dégradées (Cairney et Burke, 1994 ; Zhu *et al.*,1994).

3. Les racines des végétaux

Les racines des végétaux sont généralement concentrées dans les couches organiques et organo-minérales du sol (Mikola, 1973 ; Vogt *et al.*, 1980). En étant à proximité des biodécomposeurs des substances organiques, elles peuvent bénéficier plus rapidement d'une source permanente de nutriments simples libérés par la décomposition de la matière organique fraîche. En effet, les racines des végétaux présentent une capacité limitée à utiliser certaines formes organiques des composés du sol et elles absorbent préférentiellement les formes simples des nutriments.

Toutefois, si les fonctions de décomposition de la faune et de la microflore ne sont aucunement contestées, l'effet de la présence des racines sur la dégradation de l'humus porte à controverse. En effet, Gadgil et Gadgil (1971) ont été parmi les premiers à émettre l'hypothèse selon laquelle les racines des arbres suppriment la décomposition de la litière. Ils ont ainsi rapporté que l'exclusion ou l'enlèvement des racines de *Pinus radiata* conduisait à une accélération de la perte de litière. En revanche, d'autres auteurs ont observé l'effet inverse (Staaf, 1988 ; Zhu et Ehrenfeld, 1996).

III. LE SOL : SIEGE DE CHANGEMENTS SPATIO-TEMPORELS

Le sol est donc un milieu dynamique, siège de changements perpétuels dans l'espace et dans le temps du fait de facteurs physiques, chimiques et biologiques.

1. Changements dans l'espace

Comme cela a été indiqué précédemment, le sol est un milieu très hétérogène. Sa genèse et sa maturation ont abouti à une organisation en plusieurs couches superposées ou **horizons**. Cette stratification s'explique en partie par les mouvements verticaux de l'eau. Ainsi, les courants hydriques descendants provoquent la solubilisation de certains composés et leur entraînement en profondeur, alors que les mouvements ascendants permettent des remontées d'éléments vers la surface. Il se forme ainsi des horizons appauvris en certains éléments et des horizons d'accumulation.

Par exemple, un sol podzolique se caractérise en particulier par la présence de deux horizons profonds dit spodiques dont l'un (Bh) est enrichi en substances organiques solubles qui ont été entraînées en profondeur ; l'autre (Bs) est un horizon d'accumulation des éléments tels que le fer ou l'aluminium.

2. Changements dans le temps

Un milieu naturel est soumis aux changements de différents facteurs notamment climatiques. Ces variations peuvent agir directement ou indirectement sur le sol.

Ainsi, Dighton (1991) indique une meilleure minéralisation lorsque le taux d'humidité est adéquat et que la température n'est pas trop élevée. De même, la sécheresse et le chaleur sont des facteurs favorables à une bonne nitrification. De plus, comme nous l'avons évoqué précédemment, le fonctionnement du sol est régi par l'activité biologique laquelle est également tributaire des conditions externes. Des changements de la composition et de l'activité des organismes du sol vont donc induire soit un ralentissement du fonctionnement du sol, se traduisant par une accumulation de matière organique, soit une accélération de la fonction de décomposition. Ainsi, Klironomos et Kendrick (1995) ont indiqué que le contenu en eau et la température sont parmi les facteurs les plus importants par leur influence sur la distribution et le nombre des microarthropodes dans la litière. En effet, les périodes sèches et chaudes induisent une réduction du nombre d'espèces animales. De même, Sreng (1977) observe une activité plus intense des champignons ligninolytiques à l'automne qu'en été lorsque les températures sont élevées.

IV. LES ELEMENTS MINERAUX ABSORBES PAR LA PLANTE

Les éléments minéraux sont classés en deux groupes selon leur importance physiologique :

- un élément minéral est qualifié d'**essentiel** lorsqu'il répond aux trois critères suivants :
  - l'élément est nécessaire à la plante pour une croissance et une reproduction normales,
  - la fonction de cet élément ne peut être remplacée par d'autres éléments,
  - cet élément à une fonction directe ou indirecte dans le métabolisme de la plante,
- les éléments minéraux qui stimulent uniquement la croissance ou qui compensent les effets toxiques d'autres éléments, sont reconnus comme éléments **bénéfiques** (Heller *et al.*, 1989).

A. BIODISPONIBILITE DES ELEMENTS MINERAUX DU SOL

Les processus de dégradation de la matière organique, qu'ils soient de nature chimique ou biologique, sont donc soumis à différents facteurs climatiques et édaphiques (Weyman-Kaczmarkowa et Pedziwilk, 1997) tels que le pH du sol, la température, l'humidité, la matière

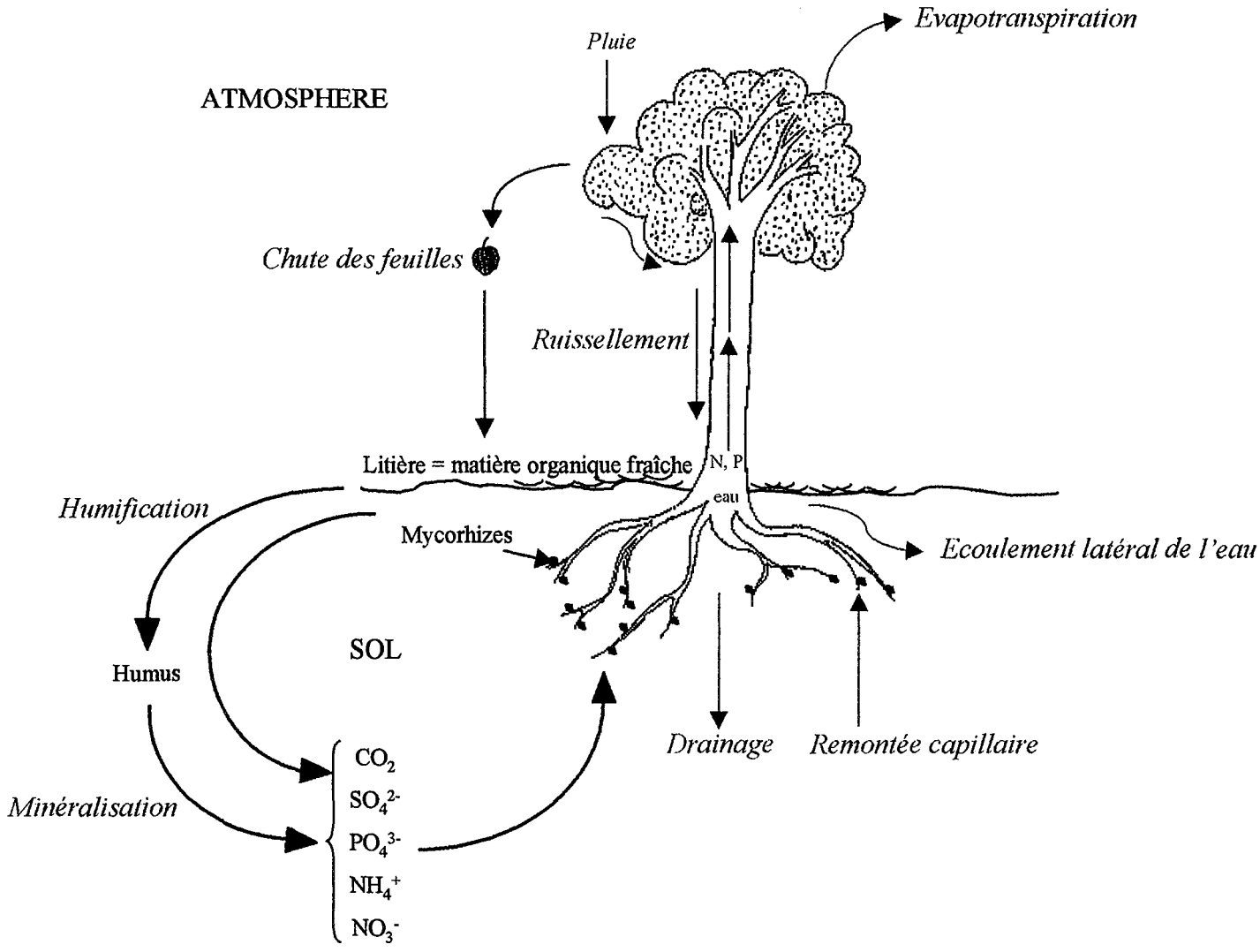


Figure 2 : Cycle de l'eau (bleu) et des éléments minéraux (rouge) dans un écosystème forestier.

organique ou encore la présence d'oxygène en quantité suffisante dans le sol. Les variations de ces facteurs induisent une activité de décomposition plus ou moins intense et rapide, aboutissant à une libération et à une disponibilité variables des éléments minéraux du sol (Berthelin *et al.*, 1995).

Cette biodisponibilité des éléments minéraux résulte de phénomènes d'adsorption-désorption, de complexation-décomplexation et de précipitation-dissolution, leur permettant de transiter par différents compartiments (sol, végétation), définissant ainsi le cycle biologique des éléments minéraux.

Le cycle biologique des éléments minéraux (figure 2) peut être résumé sous la forme d'une équation :

Prélèvements = Immobilisation + Restitution

Les prélèvements correspondent à la fraction absorbée par les racines. Cette fraction est provisoirement stockée dans la biomasse végétale sous une forme inassimilable qui est remise en circulation dans le sol, notamment lors de la chute des feuilles, permettant ainsi un recyclage des éléments minéraux.

B. NATURE DES ELEMENTS MINERAUX ABSORBES

1. Les macroéléments

Chez les plantes supérieures, les macroéléments comprennent l'azote (1 à 3% de la matière sèche), le potassium (2 à 4%), le calcium (1 à 2%), le magnésium (0,1 à 0,7%), le soufre (0,1 à 0,6%) et le phosphore (0,1 à 0,5%).

a. Le phosphore

Le phosphore est un macroélément métalloïque présent dans le sol sous forme d'anions ($H_2PO_4^-$, HPO_4^{2-}). Les réserves minérales (apatites, phosphorites) et organiques de phosphore du sol sont généralement sous une forme peu assimilable, ce qui rend la concentration en phosphore dans la solution du sol faible. En effet, sa concentration est de 0,01 à 0,5 µM dans les sols forestiers et de 1,5 µM dans les sols fertilisés (Strullu, 1988). Toutefois, le sol possède un pool « autodiffusible » de phosphore qui est en équilibre cinétique avec la solution du sol permettant de maintenir une faible concentration en phosphore sous forme assimilable.

Chez les végétaux, le phosphore est un constituant important de plusieurs composés organiques dont les acides nucléiques (ADN, ARN, ...) et les nucléotides phosphorylés tels que l'ATP (adénosine triphosphate) dont les liaisons sont à haut potentiel énergétique. Le phosphore entre également dans la composition chimique du NADP (nicotinamide-adénine-dinucléotide-phosphate) qui est un coenzyme très répandu. Par exemple, c'est le coenzyme de la GDH à NADP, enzyme catalysant la synthèse du glutamate, lequel incorpore ensuite la voie métabolique des acides aminés. Sous la forme inorganique (Pi), le phosphore est un régulateur important des transferts d'énergie (Schachtman *et al.*, 1998). Il intervient notamment dans la synthèse de l'amidon dans les chloroplastes.

b. L'azote

L'azote est essentiellement assimilable par les végétaux sous la forme minérale : soit NH_4^+ présent dans le sol sous forme échangeable, soit NO_3^- présent sous forme soluble. Cet azote inorganique représente des concentrations de 10 à 100 µM dans la solution du sol soit moins de 1% de l'azote total (Marschner *et al.*, 1991 ; Attiwill et Adams, 1993). Cependant, dans le sol, la réserve d'azote est majoritairement organique (la matière organique fraîche, les composés humiques, ...), excepté un peu d'ammonium très minoritaire, et doit donc être minéralisée pour être accessible à l'absorption par les plantes.

Dans les écosystèmes forestiers des régions tempérées et boréales, la disponibilité en azote est l'un des principaux facteurs limitant la croissance des arbres (Read, 1991). De fortes quantités d'azote peuvent être présentes dans les sols mais la plupart de cet azote est séquestré sous forme de composés organiques solubles (protéines, peptides, acides aminés) ou insolubles (Read, 1991).

Chez les végétaux, l'azote est un élément majeur puisqu'il est présent dans les acides aminés, les peptides, les protéines, les acides nucléiques, les amides, les alcaloïdes, les hormones et les vitamines.

c. Le calcium

Le calcium est important à plusieurs niveaux. D'une part, c'est un nutriment minéral, d'autre part, il joue un rôle essentiel dans la neutralisation de l'acidité du sol, le maintien de l'activité biologique et la structuration du sol. Il est en effet considéré comme un cation floculant c'est-à-dire qu'il favorise la formation des agrégats qui sont à l'origine de la structure du sol.

Ce macroélément métallique est absorbé par les racines des plantes sous la forme de sels solubles et assure un grand nombre de fonctions au sein des végétaux supérieurs.

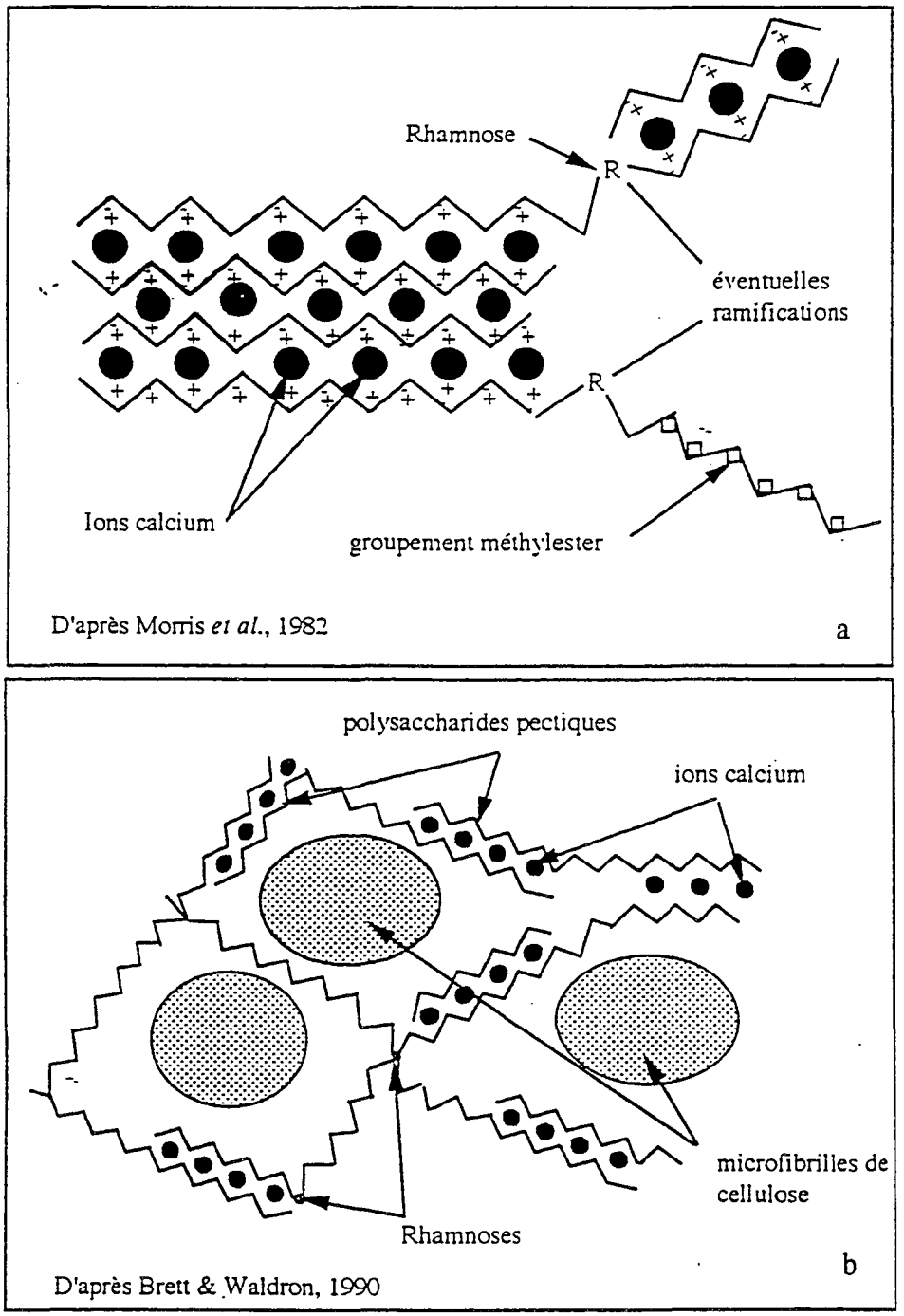


Figure 3 : Gélification des composés pectiques.

a. Les ions calcium se lient aux composés carboxyles par les acides polygalacturoniques. Il se forme alors un réseau hydrophile. La présence des résidus rhamnose permet à ces chaînes de se ramifier (d'après Morris *et al.*, 1982, modifié par Gea, 1995).

b. Organisation possible du gel pectique autour des microfibrilles de cellulose dans la paroi en croissance (d'après Brett et Waldron, 1990, modifié par Gea, 1995).

Ainsi, il joue un rôle primordial dans la stabilisation des parois et dans les phénomènes d'adhésion cellulaire (Jauneau *et al.*, 1992). En effet, les parois des cellules végétales se composent essentiellement de polysaccharides qui s'organisent de deux façons :

- elles comprennent une armature constituée de fibrilles de cellulose,

- et une matrice formée de protéines structurales et fonctionnelles, d'hémicelluloses et de pectines lesquelles sont stabilisées par les ions calcium (Roland, 1980). Les pectines sont des polysaccharides dont l'axe principal est majoritairement composé d'acide D-galacturonique, dont les monomères sont liés en α(1-4). Des unités rhamnose, branchés en α(1-2) et α(1-4), provoquent des « coudes pectiques » (Gea, 1995). Les composés pectiques forment, dans la paroi végétale, des gels calciques (figure 3). En effet, ces composés sont des polyanions (C_6-COO^-) dont les charges négatives établissent des liaisons ioniques notamment avec le calcium. Les ions calcium peuvent, grâce à leur bivalence, unir deux molécules différentes. Il se forme alors un réseau hydrophile capable de rigidifier la paroi (Rees, 1977). Le gel pectique, ainsi formé, s'organise autour des microfibrilles de celluloses.

Bien que n'étant pas un constituant des membranes cellulaires, les ions calcium sont d'une importance fondamentale dans la perméabilité membranaire, le transport et le maintien de l'intégrité cellulaire (Heller *et al.*, 1989). En effet, en raison de sa bivalence, ce cation est adsorbé par les membranes biologiques qui sont généralement chargées négativement. La fixation du calcium sur les sites négatifs des têtes polaires des phospholipides membranaires tend à les rapprocher les unes des autres, diminuant ainsi la perméabilité cellulaire.

Par conséquent, la pénétration de l'eau et de la plupart des ions, s'en trouve freinée. L'antagonisme que le calcium manifeste vis-à-vis des autres ions peut avoir des répercussions favorables ou néfastes sur la nutrition de la plante. En effet, lorsque les ions extracellulaires sont toxiques (métaux lourds par exemple) ou qu'ils sont présents à des doses excessives (oligoéléments), le calcium possède alors un effet bénéfique en réduisant leur passage dans les cellules. Ce cation peut donc servir d'élément détoxifiant à l'égard de certains éléments toxiques. En revanche, dans le cas où les ions extracellulaires sont des éléments nécessaires présents à faibles doses, la baisse de la perméabilité membranaire provoquée par la présence des ions calcium, induit des risques de carences. Le cas le plus manifeste étant celui de la carence en fer, induisant la chlorose ferrique, que l'excès de calcium provoque chez les plantes calcifuges.

Le calcium intracellulaire joue également un rôle dans l'équilibre osmotique des cellules et il contribue à la neutralisation des acides organiques (acide oxalique, citrique et tartrique) accumulés en excès dans les tissus âgés (Marschner, 1986).

Enfin, les ions calcium ont une action similaire à celle des oligoéléments puisqu'ils agissent en tant que second messager lors de la réponse des plantes à des stimuli externes et qu'ils activent certaines enzymes comme les ATPases (Evans *et al.*, 1991). Bien que leur mode d'action reste incertain, il semble qu'il favorise l'association de l'enzyme avec son substrat.

Le calcium peut donc avoir des effets néfastes ou bénéfiques. En fonction de leur tolérance aux ions calcium, les végétaux sont qualifiés de calcicoles (Chêne pubescent) ou de calcifuges (Pin maritime).

Pour les plantes calcifuges, le calcium est un élément toxique. Le caractère calcifuge semble être du à l'inaptitude que possèdent certaines plantes à réguler la fixation du calcium, qui, en excès, s'adsorbent sur les membranes provoquant des troubles de la perméabilité membranaire. En revanche, les essences calcicoles, en présence de fortes doses de calcium, sont capables de modifier la composition de leurs membranes (phospholipides notamment) dont le pouvoir de fixer le calcium diminue.

d. Le silicium

Le silicium est le second élément le plus abondant dans la croûte terrestre. Dans les sols, il entre dans la composition des argiles (kaolinite, illites, vermiculites, smectites, montmorillonites...). En effet, les argiles sont des silicates d'aluminium plus ou moins hydratés présentant une structure en feuillet. Lorsqu'il passe en solution, le silicium se trouve principalement sous la forme d'acide monosilicique ($Si(OH)_4$) qui est un acide très faible. Sa concentration varie entre 14 et 20 mg de Si / litre de solution et est généralement plus faible dans les sols dont le pH est supérieur à 7 (Marschner, 1986).

Si le silicium n'est pas indispensable à la vie, il ne présente pas d'effet toxique et est fortement recyclé par les plantes. Il est généralement considéré comme un élément minéral bénéfique pour un grand nombre d'espèces végétales comme les céréales (blé, ...) ou les *Equisetum*. Deux grandes catégories de plantes ont ainsi été définies : les plantes accumulatrices de silicium et celles qui ne l'accumulent pas.

Cet élément minéral assure un grand nombre de fonctions chez les végétaux et agit principalement au niveau des parois cellulaires.

Il intervient notamment dans la stabilisation et la rigidification des tissus végétaux. En effet, il peut être présent sous forme de dépôts inertes dans les parois cellulaires. En conséquence, la présence de silicium peut moduler la synthèse des lignines qui requièrent plus d'énergie pour leur élaboration que la formation des dépôts silicatés.

De plus, le silicium peut s'accumuler le long des parois des cellules de l'endoderme racinaire, notamment chez les plantes de culture (Bennett, 1982). Cette silicification de l'assise endodermique permet de préserver la stèle d'une invasion par des pathogènes et constitue donc une barrière physique très efficace (Marschner, 1986).

Le silicium joue également un rôle dans la disponibilité d'autres éléments. Ainsi, il semble que le silicium favorise la disponibilité du zinc, alors que son absence induit une diminution de l'incorporation du phosphore inorganique (Pi) dans les molécules telles que l'ATP, l'ADP ou les sucres phosphates.

Il prévient également les toxicités par le manganèse et le fer. Son mode d'action est encore incertain, cependant, il pourrait agir sur les activités enzymatiques ou modifier la distribution des éléments toxiques dans les organes notamment dans les parties aériennes. Le silicium améliore aussi la tolérance des plantes à l'aluminium (Marschner, 1986).

Enfin, une stimulation de la croissance du végétal peut être observée en présence de silicium. Il augmente, en effet, l'élasticité des parois cellulaires au cours de l'élongation par le biais d'interactions avec les pectines et les polyphénols.

e. L'aluminium

L'aluminium est un élément minéral présent en faible teneur dans les solutions du sol lorsque le pH est supérieur à 5,5. En revanche, pour des pH inférieurs, il se trouve principalement sous la forme échangeable (Garciduenas Pina et Cervantes, 1996).

Beaucoup de plantes sont sensibles à la teneur en aluminium et la toxicité aluminique se manifeste principalement dans les sols acides. C'est ainsi que, chez les végétaux, cet élément affecte la structure et la perméabilité membranaire en se fixant sur des sites de liaison de la membrane plasmique. Il limite ainsi l'absorption d'autres éléments (Schaedle *et al.*, 1989). Il réduit également l'activité mitotique des cellules (Mangabeira *et al.*, 1997). Néanmoins, à faible dose, l'aluminium pourrait induire une stimulation de la croissance (Kinraide, 1993 ; Ryan *et al.*, 1994). Ces auteurs expliquent ce fait par la présence d'autres cations qui, en se liant aux sites négatifs du plasmalemme entrent en compétition avec l'aluminium et limite ses effets. L'aluminium agirait également en prévenant les toxicités par d'autres éléments minéraux lorsqu'ils sont en excès tels que le manganèse ou le cuivre (Kinraide, 1993). En effet, sa fixation sur les sites de liaison membranaire limite l'absorption d'autres éléments toxiques.

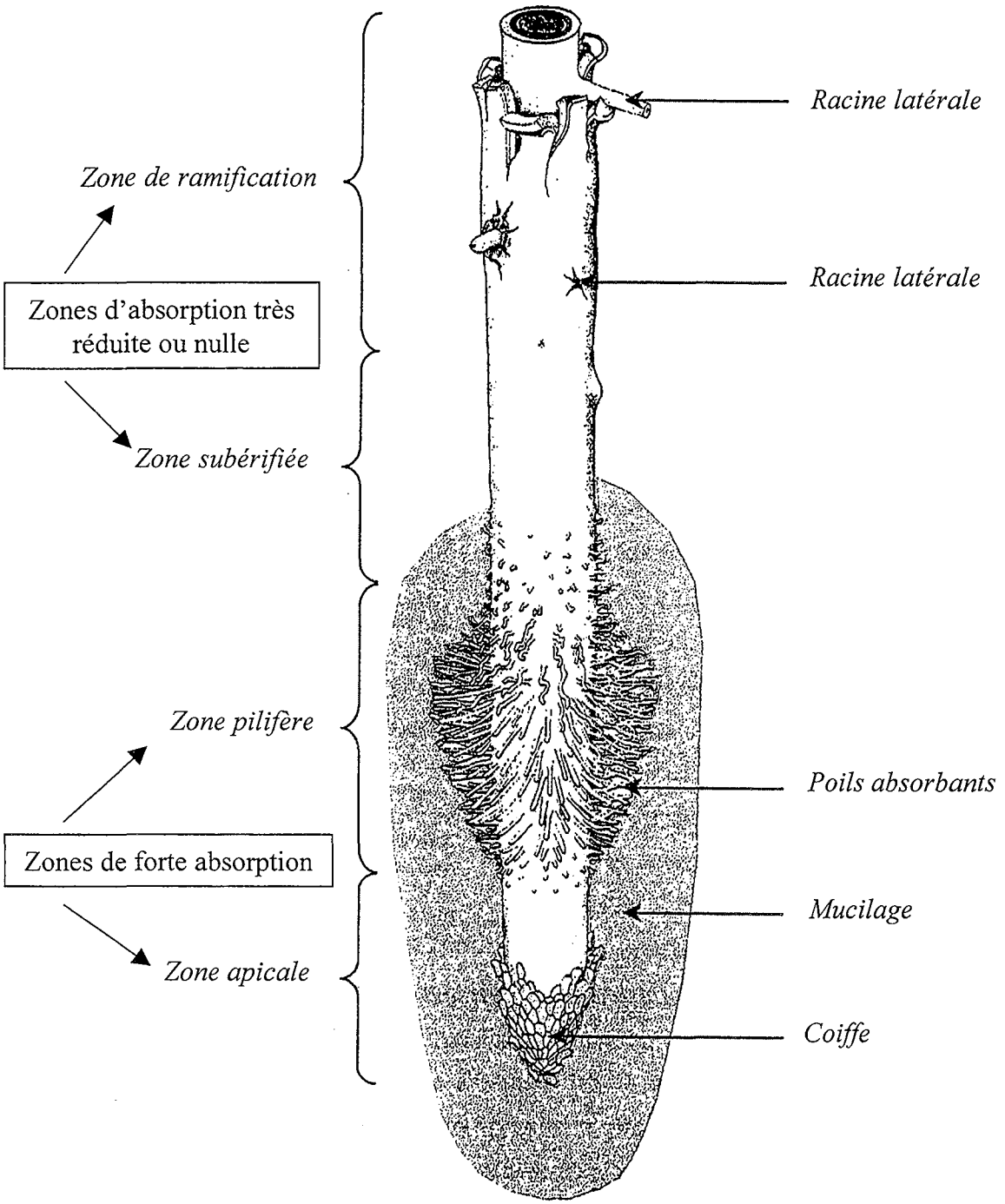


Figure 4 : Schéma tridimensionnel d'une racine primaire de plante dicotylédone, montrant l'organisation racinaire et les zones d'absorption des éléments du sol (adapté d'après Raven *et al.*, 1992).

2. Les oligoéléments

Sept oligoéléments ont été identifiés : le fer (Fe), le manganèse (Mn), le cuivre (Cu), le zinc (Zn), le bore (B), le molybdène (Mo) et le chlore (Cl) (Marschner, 1986 ; Juste, 1988).

Dans les sols, les oligoéléments jouent un rôle important dans le processus d'humification en catalysant l'oxydation des polyphénols. D'autre part, ils sont capables de former des complexes avec les composés organiques chélatants.

Les oligoéléments sont indispensables à la vie des plantes et des micro-organismes du sol. Au sein des plantes, ils interviennent à très faible dose (inférieure à 100 mg.kg-1 de matière sèche) (Trocme, 1970 ; Adriano, 1986) en tant que coenzyme dans les réactions métaboliques de la respiration (Cu, Fe), de la photosynthèse (Mn, Fe, Zn, Cu) ou encore de la réduction des nitrates absorbés par les plantes (Fe, Mo).

Si les oligoéléments interviennent à très faible dose, leur excès peut les rendre toxiques pour les végétaux. Leur toxicité provient soit de leur abondance dans les sols soit de leur grande biodisponibilité laquelle est favorisée dans les sols acides. A l'inverse, dans les sols calcaires dont le pH est supérieur à 8, des carences en oligoéléments sont souvent observées notamment du fait de l'abondance des ions calcium qui, d'une part, en occupant les sites du complexe absorbant, empêchent la mise en solution des autres éléments et qui, d'autre part, provoquent au niveau des végétaux des troubles de la perméabilité. C'est ainsi qu'en sol calcaire, les carences en manganèse et en fer ne sont pas rares.

V. LES VOIES DE L'ABSORPTION ET DU TRANSPORT DES ELEMENTS DU SOL

A. LES ORGANES RESPONSABLES DE L'ABSORPTION

La nutrition minérale d'une plante dépend de l'aptitude que possède son système racinaire à absorber l'eau et les ions présents dans le sol.

Au sein d'un système racinaire, les racines ne sont pas toutes aptes à absorber les éléments minéraux (figure 4). Ce sont principalement les racines courtes, essentiellement primaires, qui sont bien adaptées à la fonction d'absorption et qui assurent la nutrition minérale et hydrique des plantes. Toutefois, les racines longues, plutôt spécialisées dans la fonction de conduction des ions, possèdent une zone d'absorption localisée à l'apex et dans la zone sub-apicale de l'organe. En revanche, la zone basale des racines longues différencie un cortex subérifié périphérique qui réduit l'absorption des éléments minéraux.

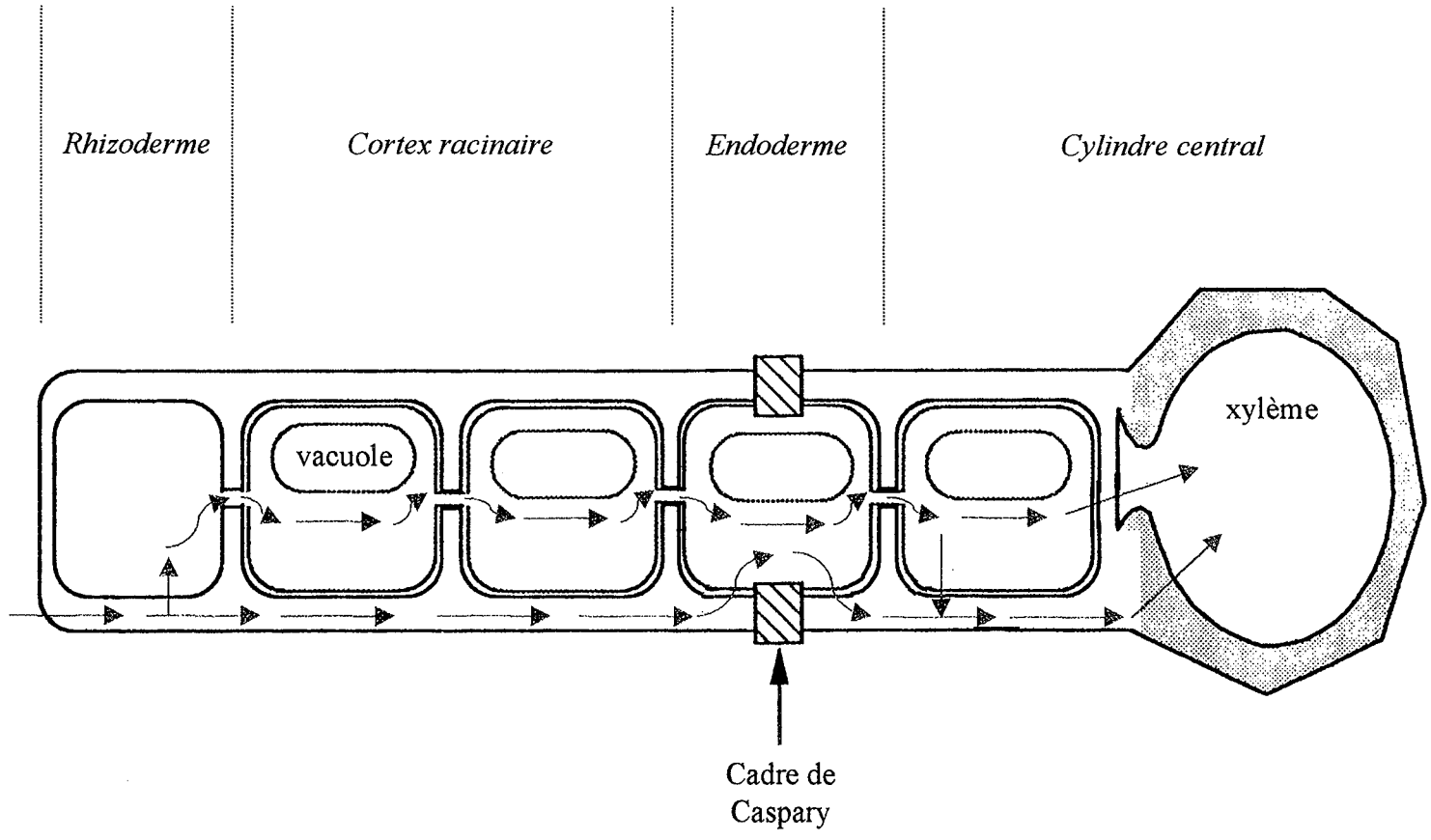


Figure 5 : Représentation schématique des voies de transport symplasmique et apoplasmique des éléments au sein des structures d'une racine non mycorhizienne (Le Disquet, 1997). ⟶ : voie symplasmique ; ⟶ : voie apoplasmique.

B. Les voies de transport des elements mineraux : le symplasme et l'apoplasme

Lorsque les éléments minéraux du sol ont été absorbés par les organes, ils doivent traverser les différents tissus biologiques pour atteindre les vaisseaux conducteurs de la plante.

Deux voies de transport ont été mises en évidence chez les végétaux : le symplasme et l'apoplasme (figure 5).

Ces deux voies de transport peuvent coexister dans un même tissu.

1. Le symplasme

Le symplasme d'un organe ou d'un tissu est formé par les continuums cytoplasmiques qui constituent la voie de transport symplasmique. Au sein des cellules végétales, les interruptions pariétales (plasmodesmes) entre des cellules contiguës permettent la continuité cytoplasmique et par conséquent, les échanges directs de cellule à cellule.

Par exemple, le silicium est un élément qui emprunte principalement la voie symplasmique chez les plantes non accumulatrices de silicium. En effet, l'absorption et le transport du silicium s'effectue via le courant d'eau qui est généré par l'évapotranspiration (Hutton et Norrish, 1974). Par contre, chez les plantes accumulatrices de silicium, l'absorption de cet élément minéral est fortement lié au métabolisme racinaire (Okuda et Takahashi, 1965). De même, le transport du phosphore suit la voie symplasmique (Van Praag *et al.*, 1993).

2. L'apoplasme

La plupart des ions peuvent suivre la voie symplasmique, toutefois, certains éléments empruntent une seconde voie de transport, l'apoplasme. C'est notamment le cas du calcium (Le Disquet, 1997) dont la concentration cytoplasmique est strictement régulée. En effet, une élévation de la teneur en ions calcium dans le cytoplasme des cellules indique un dérèglement du fonctionnement cellulaire.

L'apoplasme regroupe les structures extracellulaires : les parois, les lamelles moyennes, les jonctions cellulaires ou les méats et les périplasmes (Le Disquet, 1997).

Le transport apoplasmique des ions à travers le cortex racinaire est interrompu au niveau de l'assise endodermique. En effet, la différenciation de l'endoderme conduit à son imperméabilisation au niveau des parois transversales et radiales. C'est ainsi que des dépôts de lignine et de subérine sont progressivement incorporés à la paroi primaire au cours de la

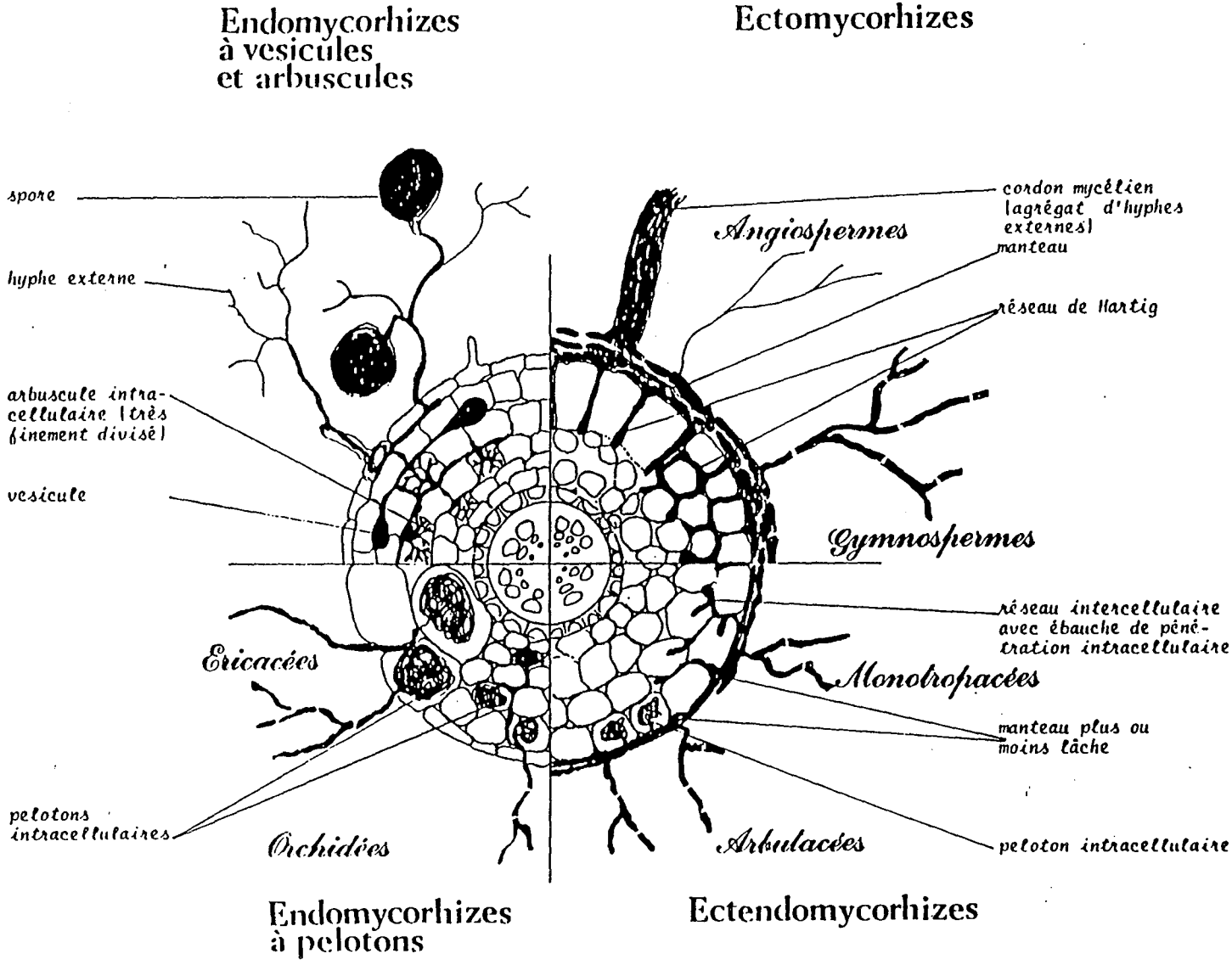


Figure 6 : Les grands types de mycorhizes.

maturation des cellules : c'est le cadre de Caspary. Les éléments rejoignent alors la voie symplasmique avant d'être déversés dans les vaisseaux du xylème.

VI. LES INTERACTIONS RACINES DES PLANTES – MICROORGANISMES DU SOL

Dans le sol, les racines des plantes sont environnées de nombreux micro-organismes. En effet, la production de mucilage au niveau des coiffes racinaires constitue une réserve de substances carbonées importante pour le développement de ces organismes. Toutefois, du fait de l'absorption des ions par les racines et les micro-organismes, la zone au voisinage des racines (la rhizosphère) est très rapidement appauvrie en éléments minéraux formant ainsi une zone de déplétion. De plus, comme cela a été évoqué précédemment, les éléments minéraux nécessaires à la croissance de la plante (P, N, ...) sont souvent impliqués dans des complexes difficilement assimilables directement par les racines. Les végétaux ont donc développé des associations symbiotiques avec différents organismes du sol, notamment les bactéries (fixation de l'azote atmosphérique) ou encore les champignons de manière à pallier ces inconvénients. Les organismes fongiques, outre la capacité à solubiliser les formes minérales complexes du sol, développent un mycélium extramatriciel qui en explorant un volume plus important de sol, augmente la surface d'absorption.

L'association des racines des végétaux avec des champignons porte le nom de **mycorhize** (du grec mukês : champignon ; rhiza : racine) et constitue le type de symbiose le plus répandu chez les plantes. Toutefois, la mycorhization des plantes n'est pas une généralité puisqu'elle est absente chez les Crucifères, les Chénopodiacées, les Saxifragacées et les plantes aquatiques.

A. LES GRANDS TYPES DE MYCORHIZES

Les mycorhizes se subdivisent généralement en trois grands groupes : les ectomycorhizes, les endomycorhizes, les ectendomycorhizes (figure 6).

1. Les ectomycorhizes

Les premières constatations d'ectomycorhizes remontent à 1885, lorsque Frank observa chez le Hêtre et le Pin, un polymorphisme racinaire du à la présence de champignons associés.

Les ectomycorhizes sont caractéristiques des systèmes racinaires de beaucoup d'essences forestières qu'il s'agisse de Gymnospermes ou d'Angiospermes. il est possible également d'en rencontrer chez certaines Rosacées, Fabacées ou Ericacées. Elles ne concernent que 3% des espèces Phanérogames. Le partenaire fongique est essentiellement un Basidiomycète

(Hyménomycète ou Gastéromycète) ou un Ascomycète (Elaphomycétacée, Tubéracée). Les ectomycorhizes s'établissent sur les ramifications secondaires et supérieures du pivot et varient par leur forme généralement plus renflée et leur couleur. Elles peuvent être isolées mais peuvent également se présenter sous la forme d'une grappe et l'on parle alors de mycorhizes racémeuses. C'est le cas de la plupart des mycorhizes observées chez le Hêtre. Parfois la présence du champignon provoque la dichotomie de la racine. Ces mycorhizes dichotomes sont communément observées chez le Pin dont elles sont caractéristiques. Si la dichotomie se répète, on parle alors de mycorhizes coralloïdes.

La morphologie des ectomycorhizes a été définie par la présence d'un **feutrage mycélien** d'abord lâche au niveau de l'apex de la mycorhize, puis plus compact au fur et à mesure qu'il progresse sur la racine jusqu'à l'enrober complètement formant le **manteau fongique**. Ce manteau peut se différencier en deux zones distinctes : un manteau externe constitué d'hyphes mortes ou en voie de dégénérescence, et un manteau interne formé d'hyphes vivantes.

A partir du manteau, la mycorhize peut ou non émettre vers l'extérieur du mycélium dont le rôle est de permettre une meilleure exploration du substrat. Ce mycélium extramatriciel peut s'organiser en structures plus ou moins complexes qui sont fonction du partenaire fongique. Par exemple, *Suillus bovinus* forme des cordons ramifiés et anastomosés, possédant un méristème apical, les rhizomorphes (Duddridge *et al.*, 1980 ; Cairney, 1992). D'autres champignons comme la truffe édifient des sortes de soies, les spinules (Carnero Diaz, 1992).

Vers l'intérieur, le champignon s'insère entre les cellules de l'assise rhizodermique et établit le **réseau de Hartig**, siège d'échanges de nature variée entre les deux partenaires. La formation du réseau de Hartig se réalise par dissolution de la lamelle moyenne par le champignon par libération d'enzymes pectinolytiques. Les parois des cellules corticales ne sont jamais rompues et le champignon reste strictement extracellulaire. Le réseau de Hartig est plus ou moins développé suivant la virulence du champignon. Il peut n'affecter qu'une assise de cellules corticales comme chez les mycorhizes de truffe ou plusieurs assises cellulaires du cortex (mycorhizes formées par *Lactarius subdulcis*) voire jusqu'à l'endoderme comme chez les mycorhizes de *Pinus sylvestris* associé à une souche surproductrice d'auxine d'*Hebeloma cylindrosporum* (Gea, 1995). Chez les Angiospermes, la présence du réseau de Hartig provoque le plus souvent une élongation radiale des cellules de l'assise rhizodermique. L'apex de la mycorhize, siège de l'infection primaire, se caractérise notamment par l'absence de réseau de Hartig. En effet, il ne prend naissance qu'en arrière de la zone apicale.

2. Les endomycorhizes

Un deuxième type de mycorhizes est représenté par les endomycorhizes. Ce sont les plus répandues parmi les Ptéridophytes jusqu'aux Angiospermes. Elles concernent environ 95% des associations symbiotiques chez les végétaux supérieurs.

Elles se différencient par l'absence de manteau fongique autour de la racine dont l'aspect extérieur ne varie pas par rapport à une racine non infectée par le champignon.

En effet, dans les endomycorhizes, le partenaire fongique est intracellulaire. Il colonise l'intérieur des cellules du cortex en repoussant le plasmalemme sans toutefois le rompre. Cependant, le champignon ne franchit jamais l'endoderme.

Trois grands types d'endomycorhizes existent : les endomycorhizes éricoïdes, les endomycorhizes des Orchidées et les endomycorhizes à vésicules et arbuscules (mycorhizes VA).

Ce dernier type mycorhizien est le plus fréquent car il représente plus de 90% de toutes les mycorhizes. Les plantes impliquées dans ce genre de symbioses appartiennent aussi bien aux Ptéridophytes qu'aux Angiospermes.

3. Les ectendomycorhizes

Ces associations allient à la fois des caractères d'ectomycorhizes (manteau fongique, réseau de Hartig) et des caractères d'endomycorhizes (pelotons intracellulaires).

Deux grandes catégories d'ectendomycorhizes peuvent être citées : les ectendomycorhizes monotropoïdes et les ectendomycorhizes arbutoïdes

B. Benefices de la symbiose ectomycorhizienne pour les deux partenaires

Si Moreau (1960) définissait la symbiose comme un conflit permanent, permettant néanmoins une survie durable, entre deux organismes, l'association symbiotique assure de nombreux avantages pour les partenaires concernés.

1. Avantages retirés par la plante hôte

L'association des racines avec des champignons mycorhiziens permet à la plante d'avoir accès à des formes peu assimilables de certains éléments minéraux qu'elle ne peut solubiliser. Les champignons peuvent en effet excréter des enzymes (protéases, phosphatases) ou des acides

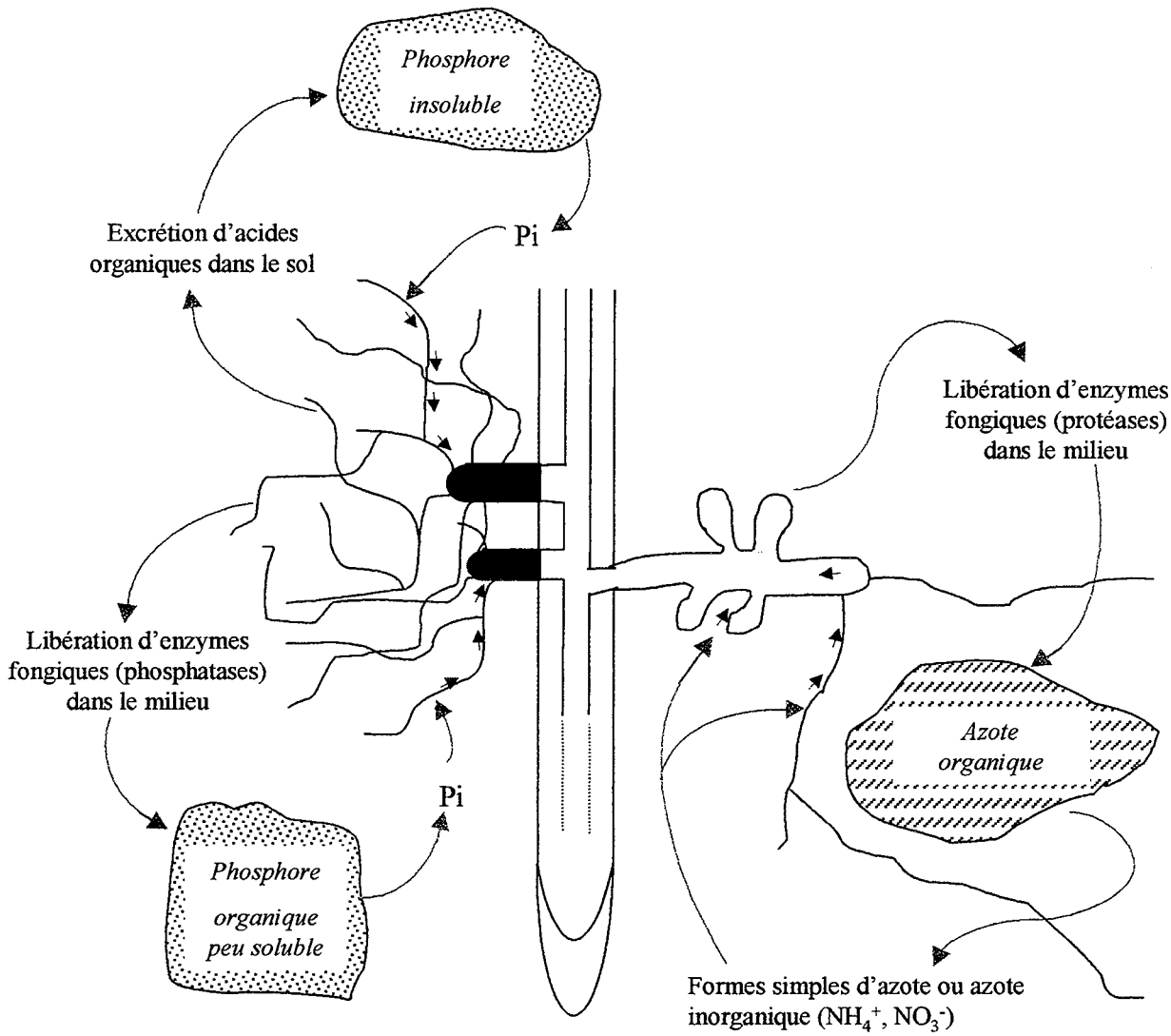


Figure 7 : Mécanismes mis en place par les champignons mycorhiziens afin d'améliorer la nutrition minérale de la plante. Des champignons mycorhiziens tels que *Cenococcum geophilum* (mycorhize noire) ou *Lactarius subdulcis* (mycorhize orangée) peuvent excréter dans le substrat des enzymes ou des acides organiques qui leur permettent d'accéder aux formes insolubles de certains éléments minéraux du sol.

organiques qui en se liant avec certains éléments minéraux, augmentent leur solubilité (figure 7).

a. Meilleur approvisionnement en eau et en nutriments du sol

Le champignon, par le mycélium extramatriciel qu'il développe, peut explorer un volume de sol beaucoup plus important que ne serait capable de le faire un système racinaire seul. De ce fait, des éléments minéraux inaccessibles aux racines, notamment dans les sols pauvres où l'on rencontre principalement les mycorhizes, sont assimilés par la plante via le champignon. Parmi les éléments minéraux difficilement accessibles aux racines, il y a, comme cela a été évoqué précédemment, l'azote et le phosphore, mais il ne faut oublier certains oligoéléments tels que le fer par exemple. Dans le cas de cet ion, certains champignons ectomycorhiziens sont capables de produire des substances chélatantes spécifiques du fer appelées sidérophores qui permettent ainsi la solubilisation de cet élément et son absorption par les racines ou les champignons (Sayer *et al.*, 1997). Les sidérophores fongiques sont des molécules organiques de type hydroxamate, qui peuvent soit être absorbées avec le fer soit rester bloquées dans le milieu externe (Watteau, 1990).

α. La nutrition phosphatée

Le phosphore est donc présent dans le sol sous une forme peu accessible pour les végétaux (Strullu, 1988). En solubilisant le phosphore inaccessible aux racines, le champignon mycorhizien assure l'approvisionnement en cet élément de la plante à laquelle il est associé (Beever et Burns, 1980 ; Schachtman *et al.*, 1998). La mycorhize stocke abondamment cet ion dans le manteau fongique qui constitue ainsi une réserve de phosphore mobilisable (Harley et Mc Cready, 1981 ; Cairney, 1992) (figure 8). Cette accumulation s'effectue en partie sous forme d'orthophosphates et de polyphosphates inorganiques (Harley et Smith, 1983), détectés notamment dans des granules vacuolaires. Dans ces granules, ces phosphates non diffusibles, forment des polymères anioniques qui s'associent à des cations tels que le calcium (Strullu, 1991) ou encore l'aluminium (Kottke *et al.*, 1995). L'amélioration de la nutrition phosphatée des plantes mycorhizées pourrait résulter de la stimulation de leurs activités phosphatases du fait de la présence des champignons mycorhiziens (Mousain, 1989). Ainsi, les activités phosphatases à la surface des mycorhizes de Hêtre sont supérieures à celles des racines non infectées (Williamson et Alexander, 1975). Dix pour-cent du phosphore absorbé par le champignon serait ainsi transféré aux tissus végétaux (Strullu, 1991).

Les mycorhizes sont donc plus efficaces que les racines non infectées pour solubiliser les phosphates inorganiques peu solubles et absorber le Pi ainsi libéré dans la solution du sol.

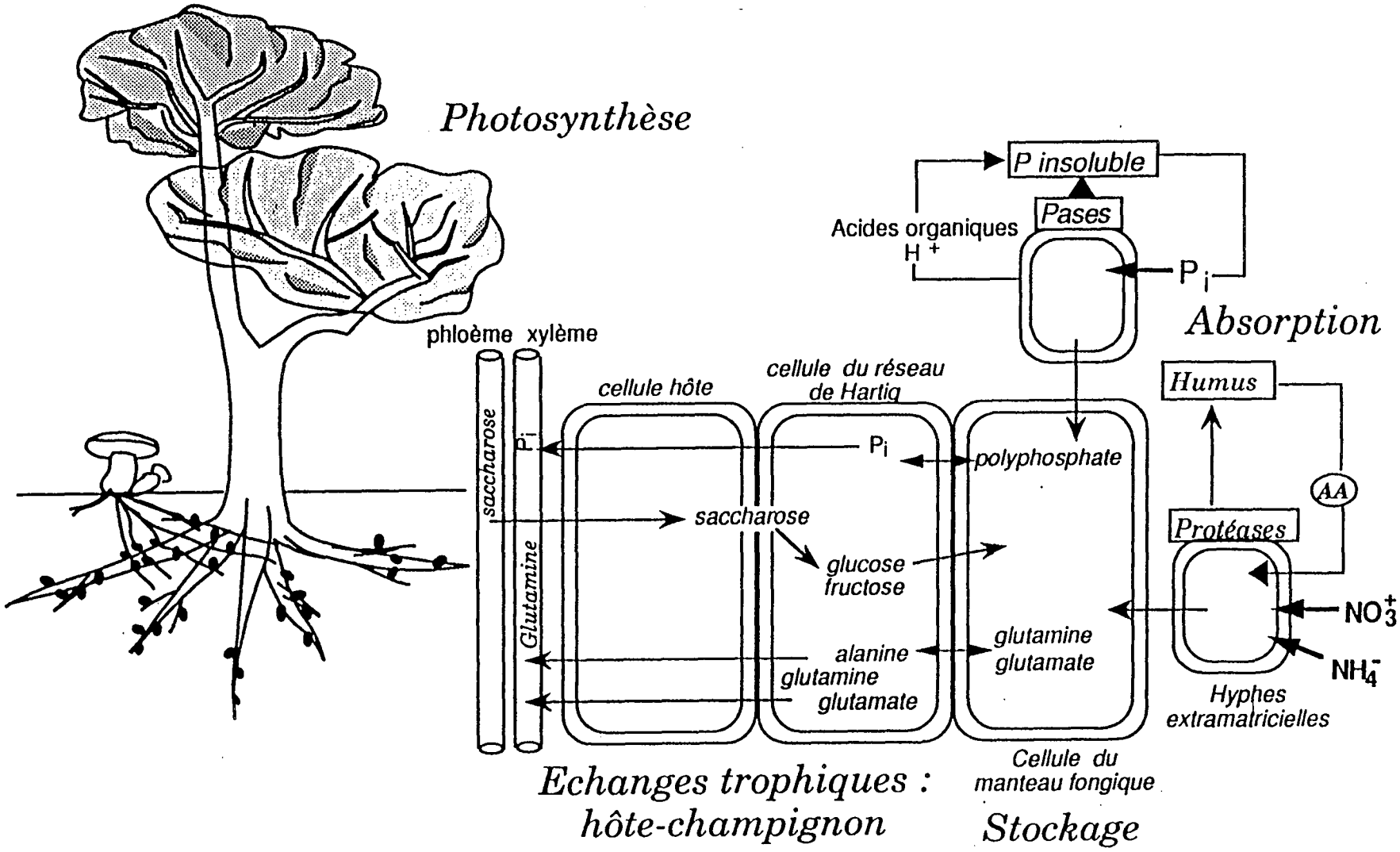


Figure 8 : Echanges nutritifs entre l'arbre hôte et le champignon mycorhizien (d'après Le Disquet, 1997).

β. La nutrition azotée

L'azote provenant de la décomposition de la matière organique peut être directement absorbé par les racines si la minéralisation est arrivée à son terme. Toutefois, une grande partie de l'azote est retenue dans des complexes azotés nécessitant alors leur dégradation préalable.

Le partenaire fongique de la mycorhize (figure 8), contrairement à la plante, possède des activités protéolytiques, lui permettant d'accéder aux fractions plus complexes d'azote comme les protéines (Botton *et al.*, 1986). Abuzinadah et Read (1989) ont, par exemple, montré que des plantes de *Betula alba* inoculés par des champignons ectomycorhiziens, tels que *Hebeloma crustuliniforme* et *Paxillus involutus*, assurent leur nutrition azotée sur des milieux contenant des protéines comme seule source d'azote. Les champignons peuvent donc absorber, assimiler et transmettre aux racines les composés azotés du sol sous une forme plus facilement assimilable par la plante (Martin et Botton, 1993).

La mycorhization stimule l'absorption de l'ammonium. Dans les mycorhizes de Hêtre, l'absorption de NH_4^+ favorise la fixation du CO_2 par β-carboxylation (Harley, 1964 ; Carrodus, 1967) et conduit en quelques heures à l'accumulation de glutamine qui représente entre 60 % et 80 % de l'azote absorbé, présent essentiellement dans le manteau fongique (Harley, 1964 ; Carrodus, 1966 ; Martin *et al.*, 1986).

L'effet de la mycorhization sur l'absorption de NO_3^- varie en fonction de la plante et du champignon. Ainsi, chez le Hêtre, il n'y a pas de stimulation nette de l'absorption du nitrate (Carrodus, 1966 ; Smith, 1972). Par contre, chez des Pins, l'infection ectomycorhizienne augmente davantage l'absorption de NO_3^- que celle de NH_4^+ (France et Reid, 1979 ; France, 1980).

γ. L'eau

Par leur grande capacité d'exploration du substrat, les champignons mycorhizogènes fournissent également l'eau nécessaire à la plante hôte pour son développement. Cet approvisionnement hydrique se fait par l'intermédiaire du mycélium extramatriciel qui prospecte le sol. Les rhizomorphes, que développent certains champignons, constituent des structures particulièrement bien adaptées au transport de l'eau. En effet, ces organes mycéliens sont très peu cloisonnés et pratiquement dépourvus de cytoplasme.

L'approvisionnement hydrique du végétal pendant les périodes sèches est également amélioré. En effet, les plantes mycorhizées, soumises à des périodes de sécheresse, ont un meilleur développement que celles non mycorhizées (Reid, 1979 ; Gianinazzi-Pearson et Diem,

1982).

b. Autres avantages

α. Longévité accrue des racines absorbantes

Une ectomycorhize demeure fonctionnelle plus longtemps qu'une racine non infectée (Harley, 1958). Chez le Hêtre, cette durée pourrait être de l'ordre de 9 mois.

Cet aspect doit expliquer en partie l'amélioration notable de la croissance des plantes mycorhizées par rapport aux plantes non infectées.

β. Protection phytosanitaire

Les champignons ectomycorhiziens peuvent constituer une véritable barrière, infranchissable par les agents pathogènes (Strullu, 1991). En effet, lorsque les conditions du milieu leur sont favorables, ces organismes symbiotiques croissent activement et deviennent dominants à proximité des racines. De ce fait, la majeure partie des exsudats racinaires est détournée au profit des agents mycorhiziens, ne laissant que peu d'éléments nutritifs aux autres organismes telluriques ce qui limite leur développement. Ainsi, le champignon *Pisolithus arhizus*, associé à *Pinus taeda*, minimise les méfaits du *Rhizoctonia solani*. De même, *Cenococcum graniforme* protège les plantules de *Pinus clausa* contre les attaques du *Phytophthora cinnamomi*.

D'autre part, certains organismes mycorhiziens peuvent également produire des substances limitant voire inhibant totalement le développement d'autres organismes. C'est par exemple le cas des Lactaires ou de *Leucopaxillus cerealis* var. *piceina* qui possèdent une activité contre certaines bactéries. Cependant, d'autres champignons comme *Pisolithus tinctorius* ou les Russules, en sont totalement dépourvues (Boullard, 1990). Certaines des substances inhibitrices ont été identifiées comme étant des antibiotiques tels que la chloromycorhizine A et la mycorhizine A (Kope et Fortin, 1989).

γ. Adaptation sur des sols défavorables

De nombreux éléments du sol deviennent toxiques lorsqu'ils sont présents en quantité trop importante. Des études ont été menées dans ce sens concernant les ions calcium.

Ainsi, Clément *et al.* (1977) ont montré que le Pin noir d'Autriche est une espèce capable de se développer dans des sols calcaires lorsqu'elle est mycorhizée alors que cet arbre est calcifuge en l'absence de mycorhization. En effet, en l'absence de mycorhizes, le Pin noir

d'Autriche présente une chlorose sévère s'accompagnant de troubles du métabolisme azoté et d'une absorption massive de cations. En revanche, la chlorose disparaît rapidement lorsque la mycorhization s'installe. Donc, les mycorhizes peuvent favoriser la nutrition minérale de l'hôte notamment en diminuant l'apport calcique aux racines, évitant ainsi les dysfonctionnements qui pourraient en découler. Elles contribuent ainsi fortement à l'adaptation de végétaux sur des sols défavorables.

2. Avantages retirés par le champignon mycorhizien

a. Fourniture de squelettes carbonés

Pendant longtemps, les systématiciens se sont posés la question de savoir dans quel règne classer les champignons. Faisaient-ils partie ou non des végétaux ? Les chercheurs s'accordent maintenant pour en faire un règne à part. La première raison est la présence de chitine, substance absente dans le règne végétal, dans les parois des cellules. D'autre part, ce sont des organismes non chlorophylliens.

De ce fait, les champignons sont tous hétérotrophes vis-à-vis du carbone, et la plupart le sont pour les vitamines telles que la biotine et la thiamine (Iassac, 1992). Ils nécessitent donc des squelettes carbonés simples provenant d'autres organismes pour croître et survivre. En effet, nous avons déjà évoqué le fait que les champignons mycorhiziens utilisent difficilement les composés carbonés complexes du sol tels que la cellulose ou la lignine.

Dans les ectomycorhizes, la plante va donc fournir à son associé les composés carbonés indispensables à son développement sous forme de saccharose, de glucose et de fructose provenant de la photosynthèse (Read, 1991 ; Francis et Read, 1994). Le carbone fourni, est stocké principalement sous forme de mannitol et de glycogène dans le champignon.

b. Biologie des champignons mycorhiziens

Les associations ectomycorhiziennes sont plus ou moins spécifiques. Il est fréquent de rencontrer différents symbiontes fongiques associés au même système racinaire comme chez le Hêtre. A l'inverse, certains champignons sont inféodés à une essence végétale et ne peuvent fructifier que s'ils leur sont associés. C'est le cas du *Xerocomus subtomentosys*, de *Laccaria laccata* ou de *Paxillus involutus*. Parfois, la présence de l'hôte végétal est requise pour la simple croissance du champignon. Ainsi les agents fongiques responsables de la formation des endomycorhizes VA ne peuvent être cultivés en culture pure en l'absence de la plante-hôte.

c. les facteurs de croissance

Il a été montré chez certaines plantes mycorhizées une augmentation des quantités de substances hormonales telles que gibbérellines, cytokinines, auxines. En effet, la formation, par exemple, des endomycorhizes VA semble provoquer chez la plante-hôte une augmentation de la concentration en cytokinines et en composés ressemblant à l'acide gibbérellique, ainsi qu'une diminution de la production d'acide abscissique (Allen *et al.*, 1980, 1982). D'autre part, les champignons mycorhiziens peuvent produire des substances apparentées aux facteurs de croissance végétaux. Ainsi, au moins un champignon endomycorhizien VA est capable de synthétiser des cytokinines et de l'acide gibbérellique (Barea et Azcon-Aguilar, 1982). Chez les ectomycorhizes, l'influence de ces composés se traduit par une prolifération des ramifications des racines mycorhizées. Cela est particulièrement bien visible chez les mycorhizes formées par une souche surproductrice d'auxines d'*Hebeloma cylindrosporum* en association avec le Pin. La dichotomie caractéristique des mycorhizes de Pin se multiplie, aboutissant à la formation d'ectomycorhizes coralloïdes (Le Disquet, 1997).

Parmi tous les éléments absorbés, les nutritions azotée et phosphatée ont été très étudiées notamment en laboratoire. En effet, ces deux éléments, présents sous forme relativement complexe dans le sol, constituent souvent les facteurs limitants de la croissance des végétaux. En revanche, l'absorption d'autres macroéléments tels que le calcium ou le silicium ont suscité un peu moins d'intérêt.

Le but de ce travail est donc de comparer au cours des saisons le rôle de deux champignons mycorhiziens dans la nutrition minérale des plantes en conditions naturelles dans différents sols forestiers.

Après une introduction présentant le contexte général de l'étude et une description des sites d'étude, des matériels et des méthodes employées, les résultats s'organisent en trois grands chapitres :

Le chapitre I a pour objectif de caractériser les modèles mycorhiziens étudiés de manière à définir une référence pour les chapitres ultérieurs. Il s'agit des mycorhizes établies entre le Hêtre (*Fagus sylvatica* L.) et deux champignons, un Ascomycète, *Cenococcum geophilum* L. et un Basidiomycète, *Lactarius subdulcis* Fr., ss. Q., Lange. L'appartenance taxonomique différente des deux champignons permettra d'observer des modifications liées à la nature du partenaire fongique de la symbiose.

Cette étude a été menée, dans un premier temps, sur des mycorhizes récoltées pendant

l'été, dans une rendzine brunifiée de la forêt domaniale de Haye (site de la Crédence). L'étude a concerné la morphologie, l'histologie et l'ultrastructure des mycorhizes. La cytolocalisation de certains éléments minéraux du sol (calcium, azote, silicium, phosphore, ...) a également été réalisée de manière à appréhender le comportement du champignon mycorhizien face aux éléments du sol. L'étude des racines porteuses de ces mycorhizes permettra d'aborder la part des éléments transmis par la mycorhize au reste du système racinaire.

Dans **le chapitre II**, les modèles mycorhiziens et leurs racines porteuses sont définis à la même époque (l'été) dans un second sol, acide, un sol podzolique situé dans la forêt domaniale de Bezange (site de Bezange). Les résultats obtenus doivent permettre de mettre en évidence un effet du type de sol sur les mycorhizes notamment sur leur morphologie et leur ultrastructure, de même que sur la prise en charge des ions du sol par les champignons.

La littérature a mis en avant l'importance des facteurs du milieu sur le fonctionnement des sols et des organismes vivants qu'ils renferment. Nous nous proposons donc dans **le chapitre III** d'étudier les variations saisonnières des organes étudiés dans chacun des deux sols. Les résultats obtenus sur les échantillons récoltés au printemps, à l'automne et en hiver seront comparés à ceux correspondant aux échantillons estivaux. Ils nous permettront de mettre en évidence des variations dues aux facteurs climatiques mais également aux besoins respectifs des deux partenaires au cours des saisons.

Enfin, une conclusion générale rassemblera nos principales conclusions et présentera les perspectives de travaux à venir.

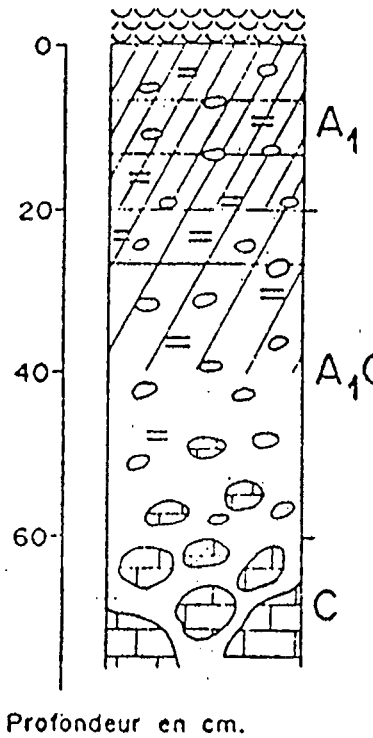
SITES, MATERIELS ET METHODES

Figure 9 : Hêtre âgé de 150 ans environ, localisé dans la station de Bezange (Meurthe-et-Moselle Nord-Est de la France), au niveau duquel une partie des prélèvements a été effectuée.

LA CREDENCE : Rendzine forestière brunifiée à mull calcaire.

I.G.N. 1/50 000 TOUL (Meurthe-et-Moselle) – E : 6°05'34'' – N : 48°39'58'' – Altitude : 370 m.
Parcelle 259 de la forêt domaniale de Haye.
Topographie : pente forte : 30% vers l'est.
Roche mère : grouine colluvionnée sur calcaire bajocien.
Caractéristiques climatiques : pluviométrie moyenne : 800 mm – Température moyenne : 9°6.
Végétation : Hêtraie-chênaie à charme – *Ligustrum vulgare*, *Cornus sanguina*, *Viburnum lantana.*

a. Profil du sol de la station de la Crédence.



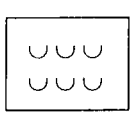
Litière de feuilles de hêtre (1 à 3 cm)

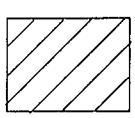
Horizon humifère de couleur brun foncé (10 YR 2/2). Structure polyédrique très fine. Texture limono-sablo-argileuse avec de nombreux petits cailloux calcaires de 5 mm. Limite peu nette avec l'horizon A1C. Très nombreuses racines fines.

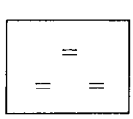
Rouge jaunâtre à l'état humide (5 YR 4/6). Structure polyédrique fine. Texture sablo-limoneuse avec de très nombreux petits cailloux calcaires. Limite peu nette avec l'horizon C.
Nombreuses racines fines.

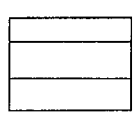
Roche mère de couleur brun très pâle (10 YR 8/4) constituée de cailloux calcaires de l'ordre de 5 mm, caillous enrobés d'une partie fine blanchâtre. Présence de bandes très blanches de pseudo-mycélium (calcaire précipité). Quelques racines noires.

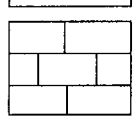
Les différents horizons indiqués dans le profil du sol.


Couche organique peu décomposée (Ao)


Horizon humifère organique


Carbonate de chaux


Argile (avec oxyde de fer absorbé)


Roche mère calcaire non altérée

b. Tableau récapitulatif des caractéristiques physico-chimiques des différents horizons de la rendzine.

Prof. cm	Hor.	Granulométrie % Après décarbonatation			M.O	C %	N %	C/N	pH	Bases échangeables m.e./100g					100 S/T	Sesq. libres ‰		
		L.G.	L.F.	A.						Ca	Mg	K	S	T		Fe	Al	Si
0-10	A1	13.3	24.1	26.2	15.0	7.5	0.52	15	7.4	37	0.80	0.59	38.4	45.5	86	3.0	2.4	0.6
10-20		11.3	21.6	24.0	5.4	2.7	0.25	11	8.1	45	0.74	0.45	46.2	21.1	Sat.	2.7	2.0	0.6
20-40	A1C	5.9	14.0	10.0	0.9	0.44	0.04	11	8.6	34	0.22	0.15	34.4	7.4	Sat.	1.6	0.6	0.5
40-80	C	2.4	11.5	7.1	0.8	0.38	0.02	22	8.9	31	0.25	0.12	31.4	4.2	Sat.	1.0	0.4	0.3

Figure 10 : Fiche signalétique de la rendzine de la station de la Crédence (Forêt de Haye, Meurthe-et-Moselle) (in Brison, 1978).

SITES, MATERIELS ET METHODES

I. MATERIELS BIOLOGIQUES ET SITES ETUDIES

Les différents échantillons étudiés ont été prélevés dans deux sites naturels présentant des caractéristiques pédologiques très différentes mais dans lesquels la végétation arborée est similaire. Il s'agit en effet de deux hêtraies du Nord-Est de la France, en Meurthe-et-Moselle.

A. LE PARTENAIRE VEGETAL

Le Hêtre (*Fagus sylvatica* L.) est une Angiosperme appartenant à la famille des Fagacées (figure 9). Ce feuillu à feuilles caduques occupe plus du quart de la Région Lorraine. Il colonise pratiquement tous les types de sol à l'exception des plus hydromorphes et constitue le trait dominant des paysages forestiers lorrains.

Son système racinaire peu profond, facilite les prélèvements (Riedacker, 1981). Les racines courtes sont pratiquement mycorhizées à 100% (Sougnez-Rémy *et al.*, 1993). En effet, de nombreux champignons peuvent s'associer aux racines courtes du Hêtre pour former des mycorhizes de couleur, de taille et de morphologie très différentes (Voiry, 1981).

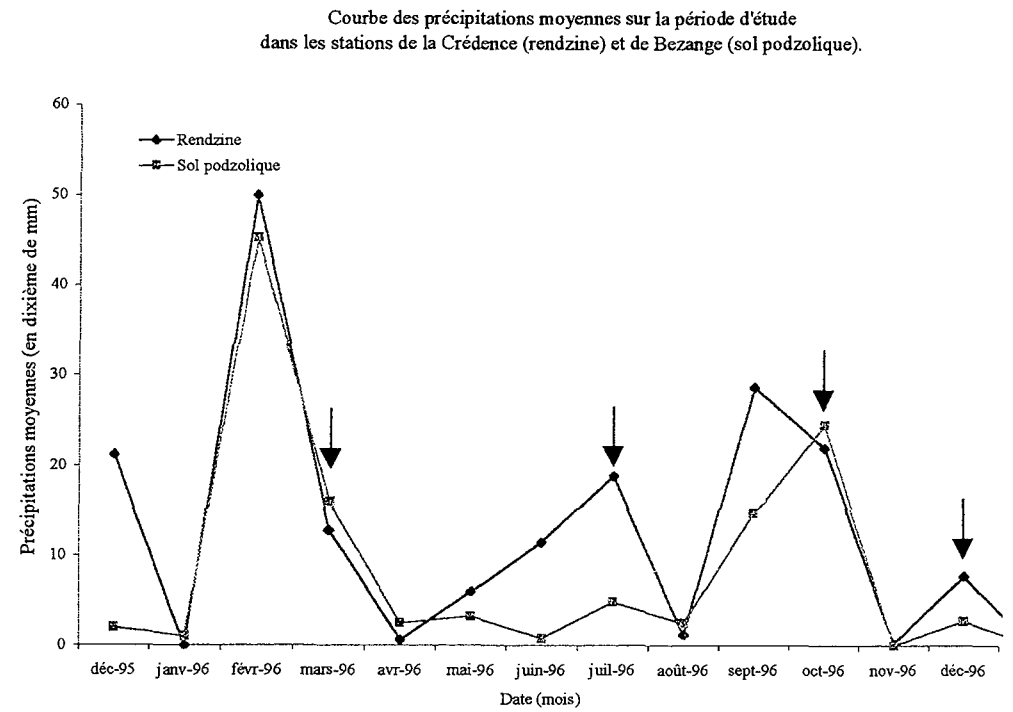
La présence du Hêtre sur des sols présentant des caractéristiques très différentes permet l'étude de l'influence du substrat sur les racines et les organismes qui leur sont associés.

B. LES HETRAIES SUR DEUX SOLS DIFFERENTS

1. Le Hêtre sur la rendzine brunifiée : le site de la Crédence

Les prélèvements ont été effectués en partie dans le site de la Crédence dont le sol est basique et calcaire (pH de l'ordre de 8) et qui est localisé dans la forêt domaniale de Haye (Nancy, Meurthe-et-Moselle). Ce sol repose sur une roche mère composée de grouine (matériau calcaire fin) colluvionnée sur calcaire bajocien. La fiche signalétique correspondant à cette station est présentée dans la figure 10.

L'activité biologique intense est assurée en grande partie par les champignons dits de "pourriture blanche" et permet la décomposition rapide de la matière organique fraîche. Elle conduit ainsi à l'élaboration d'un humus de type mull calcaire.



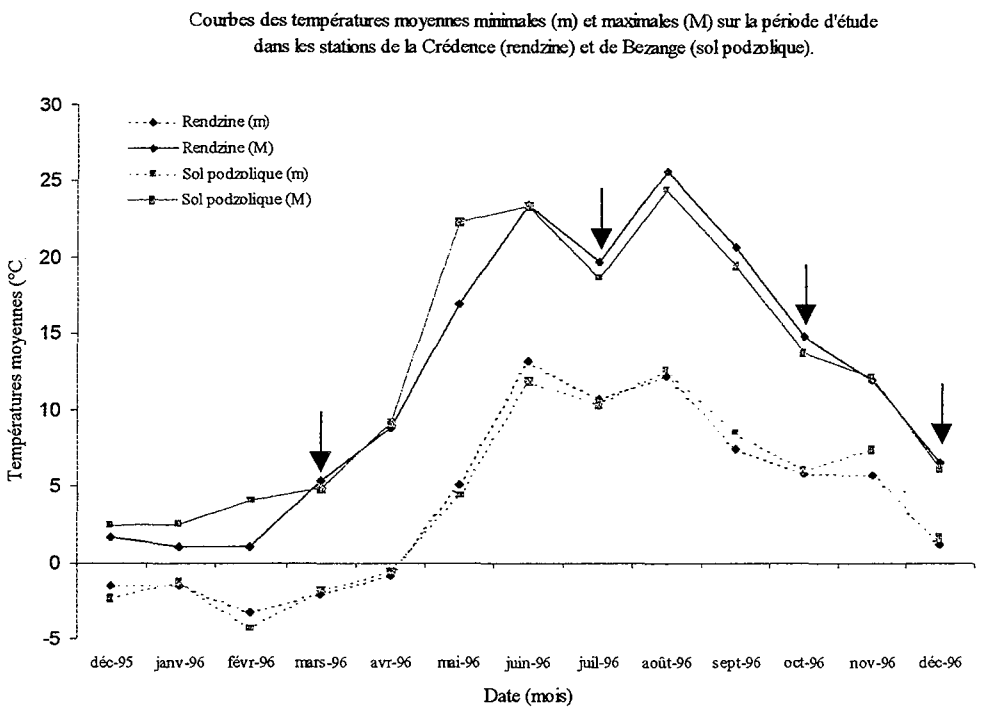


Figure 11 : Courbes des précipitations et des températures moyennes pendant l'année 1996, dans les stations de la Crédence (rendzine de la Forêt domaniale de Haye, Meurthe-et-Moselle) et de Bezange (sol podzolique de la Forêt domaniale de Bezange, Meurthe-et-Moselle) (d'après le centre INRA de Champenoux et l'ONF de Nancy). Les flèches représentent les principaux prélèvements.

Ce sol est caractérisé par une faible quantité de cations acides (H^+, Al^{3+}) et par une forte teneur en cations basiques, ou bases échangeables (Ca^{2+}, Mg^{2+}, K^+, Na^+), lesquels conditionnent le pH élevé tout au long du profil du sol. Ces cations basiques sont stabilisés par les charges négatives des colloïdes, et notamment des argiles qui sont relativement abondantes (26% environ dans les dix premiers cm de l'horizon A1). Ces cations sont susceptibles de subir des phénomènes d'échange avec la solution du sol et peuvent donc être facilement disponibles pour l'absorption minérale par les organismes du sol. Ces bases échangeables, principalement sous forme extractible, sont représentées majoritairement par le calcium (37 m.e./100g) et minoritairement par le potassium (0.59 m.e./100g) et le magnésium (0.80 m.e./100g). Cette forte proportion de calcium sous forme échangeable est révélée par une effervescence importante des particules du sol au test de l'acide chlorhydrique dès la surface.

La strate arborée se compose de Hêtres mais Chênes (*Quercus robur* et *Q. petraea*) et Charmes (*Carpinus betulus*) sont également présents. Dans le sous-bois sont présents *Ligustrum vulgare*, *Cornus sanguina*, *Viburnum lantana*.

Les données météorologiques (températures moyennes et précipitations moyennes) ont été fournies par l'ONF de la division de Nancy-Toul et sont rassemblées dans la figure 11.

2. Le Hêtre sur sol podzolique : le site de Bezange

La deuxième hêtraie, dont les arbres sont âgés de 120 ans environ, est localisée dans la forêt domaniale de Bezange (Bezange, Meurthe-et-Moselle). Elle repose sur un sol de plaine qui correspond à un sol podzolique acide (pH de l'ordre de 4) développé sur une roche mère constituée de grès rhétien. La figure 12 présente les caractéristiques de cette station.

Ce sol est biologiquement peu actif, c'est-à-dire que la matière organique est dégradée très lentement, ce qui aboutit à la formation d'un humus épais de type moder. Ce lent turn-over de la matière organique est en partie assurée par les Diptères. Les champignons ligninolytiques sont très peu représentés dans ce sol (Toutain, 1974).

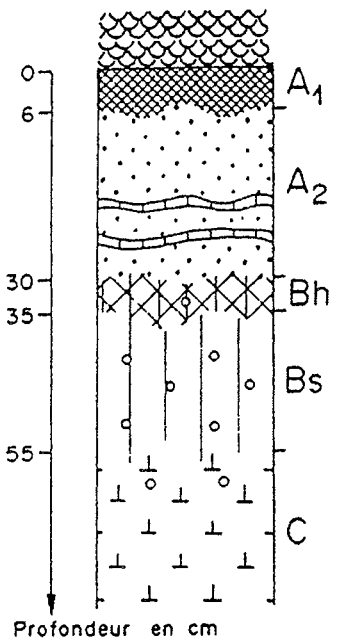
Ce sol podzolique est un sol pauvre en éléments minéraux nutritifs susceptibles d'être absorbés par les organismes du sol. En effet, il est caractérisé par une faible quantité de bases échangeables (K^+, Mg^{2+}, Ca^{2+}, Na^+). En revanche, la présence d'une forte proportion de cations acides (H^+ et Al^{3+}) explique le pH très bas.

La faible teneur en cations basiques, dont le calcium représente la majeure partie, peut s'expliquer par la faible quantité d'argiles notamment dans l'horizon A1 (1.3%). La proportion peu élevée de charges négatives ne permet pas la stabilisation des éléments minéraux (principalement du

BEZANGE : Podzol humo-ferrugineux à moder

I.G.N. 1/50 000 PARROY-ARRACOURT (Meurthe-et-Moselle) – E : 6°31'36'' – N = 48°44'52'' – Altitude : 295 m.
Parcelle 52 de la forêt domaniale de Bezange-la-Grande.
Topographie : replat de sommet – pente faible : 2% vers le sud.
Roche mère : grès rhétien (Lias inférieur).
Caractéristiques climatiques : pluviométrie moyenne : 750 mm – Température moyenne : 9°9.
Végétation : Hêtraie-chênaie à prédominance de hêtre – *Pteridium aquilinum*, *Lonicera periclimenum*, *Luzula altica*

a. Profil du sol de la station de Bezange.



Litière de feuilles de hêtre (3 à 4 cm)

Horizon humifère de couleur gris brunâtre clair (7.5 YR 5/1). Structure grumeleuse fine, assez marquée à l'état sec. Texture sableuse. Limite sinueuse assez nette avec l'horizon A2. Petites racines.

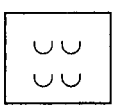
Brun grisâtre à l'état humide (7.5YR 4/3) et gris clair à l'état sec présentant en hiver et au printemps de fines zébrures horizontales de couleur plus foncée (5 YR 4/3). Structure particulaire. Texture sableuse. Limite sinueuse avec Bh. Peu de racines.

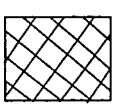
Horizon humifère, brunâtre (7.5 YR 4/3) avec taches brun foncé. Structure particulaire nette. Texture sableuse. Limite peu nette avec l'horizon Bh. Nombreuses racines fines.

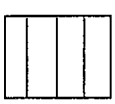
Horizon brun jaunâtre (10 YR 5/8) bien homogène à structure particulaire. Texture sableuse. Limite peu nette avec la roche mère. Racines très peu nombreuses.

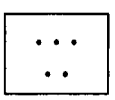
Roche mère de couleur jaune-orange (10 YR 6/4), sableuse avec des couches horizontales plus compactes et plus ou moins claires. Nombreux petits blocs ferrugineux aplatis peu friables.

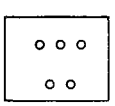
Les différents horizons indiqués dans le profil du sol.

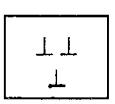

Couche organique peu décomposée (Ao)


Horizon humifère particulaire peu actif


Accumulation de fer ferrique hydraté (ocre vif ou rouille)


Horizon cendreux


Alumine libre


Roche mère en cours d'altération

b. Tableau récapitulatif des caractéristiques physico-chimiques des différents horizons du sol podzolique

Prof. cm	Hor.	Granulométrie %						C %	N %	C/N	pH	Bases échangeables m.e./100g					100 S/T	Sesq. Libres ‰		
		S.G.	S.F.	L.G.	L.	A.	M.O					Ca	Mg	K	S	T		Fe	Al	Si
0-6	A1	0.7	85.5	1.1	5.4	1.3	6.0	3.0	0.194	16	3.5	4.70	0.40	0.48	5.58	20.2	27.6	2.4	0.5	0.6
6-30	A2	1.0	88.7	2.9	5.1	1.5	0.6	0.3	0.023	13	3.6	0.29	0.07	0.02	0.38	1.5	24.4	1.4	0.1	0.6
30-35	Bh	1.0	81.6	3.0	6.6	5.6	2.4	1.2	0.068	18	3.2	0.27	0.07	0.09	0.43	7.1	6.1	5.0	1.0	0.6
35-55	Bs	1.2	83.0	3.0	5.3	6.3	1.2	0.6	0.032	19	3.5	0.23	0.05	0.06	0.34	5.2	6.5	4.0	1.6	0.6
> 55	C	1.2	83.9	2.8	6.0	5.5	0.6	0.3	0.023	13	3.8	0.33	0.05	0.05	0.43	4.4	9.8	3.6	1.2	0.8

Figure 12 : Fiche signalétique du sol podzolique de la station de Bezange (Bezange, Meurthe-et-Moselle) (d'après Toutain, 1974).

calcium) dans les horizons prospectés par les racines. Ils sont alors entraînés en grande partie vers les horizons profonds du sol où ils peuvent soit s'accumuler si les conditions physico-chimiques le leur permettent, soit rejoindre les nappes phréatiques profondes.

Sur ce sol podzolique, la strate arborée se compose d'une hêtraie – chênaie à prédominance de Hêtres. La strate du sous-bois est très éparse et essentiellement composée d'espèces acidiphiles telles que *Ptéridium aquilinum, Lonicera periclimenum, Luzula albida* et *Luzula altica.*

Les données météorologiques ont été fournies par l'INRA de Champenoux et sont indiquées dans la figure 11.

C. LES CHAMPIGNONS MYCORHIZIENS

Parmi tous les types de mycorhizes rencontrés, deux ont été choisis, en raison de leur présence observée simultanément dans les deux sols étudiés.

1. Les mycorhizes de *Cenococcum geophilum* L.

Le premier type mycorhizien a été identifié comme étant issu de l'association entre les racines de Hêtre et *Cenococcum geophilum* suivant les critères morphologiques définis par Trappe (1962).

Cenococcum geophilum est un champignon stérile faisant partie des Deutéromycètes. Il s'apparente aux Ascomycètes de par les caractéristiques des septums des articles mycéliens. Le mycélium pur est de couleur noire (figure 13A).

2. Les mycorhizes de *Lactarius subdulcis* Fr., ss. Q., Lange

Le deuxième type retenu correspond à des mycorhizes formées par *Lactarius subdulcis.*

Ces ectomycorhizes ont été identifiées selon des critères morphologiques et ultrastructuraux définis par Prévost et Pargney (1995).

Lactarius subdulcis appartient à la classe des Basidiomycètes. Il fait partie de la famille des Russulacées et de l'ordre des Agaricales. Le mycélium en croissance active est de couleur crème et devient orangé en vieillissant (figure 13B, 13C).

II. PRELEVEMENTS DES ECHANTILLONS BIOLOGIQUES

Les différents prélèvements sont résumés dans la figure 14.

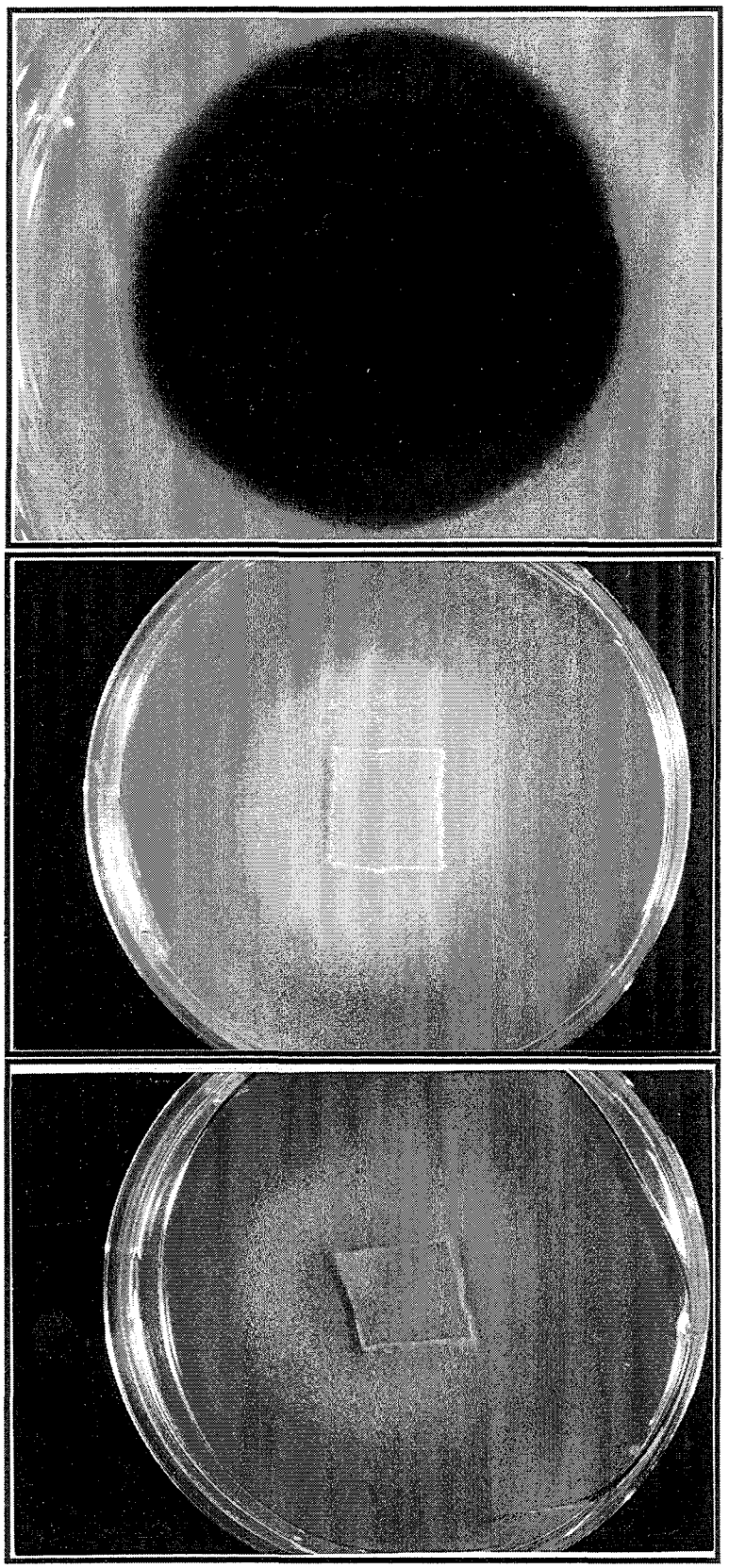


Figure 13 : Aspect en culture pure des mycéliums des deux champignons étudiés.

A. Colonie noire de *Cenococcum geophilum* L.

B. Jeune colonie de *Lactarius subdulcis* Fr., ss. Q., Lange, de couleur crème.

C. Colonie âgée de *Lactarius subdulcis* Fr., ss. Q., Lange, de couleur orangée.

Les racines superficielles du Hêtre proliférant dans la litière et l'horizon A1, les prélèvements ont donc été réalisés dans ces deux strates du sol.

Des mycorhizes formées par *Lactarius subdulcis* et *Cenococcum geophilum* ont été récoltées ainsi que des portions de racines porteuses de ces organes symbiotiques.

Dans le but de contrôler le pH du sol situé au voisinage du système racinaire étudié, un prélèvement de la litière et de l'horizon A1 a été effectué dans chaque type de sol, lors de chaque prélèvement.

Afin d'obtenir un échantillonnage représentatif de la population mycorhizienne du système racinaire du Hêtre, des mycorhizes ainsi que des racines portant ces mycorhizes ont été récoltées en 5 points différents autour d'un même arbre, à environ 1 m à 2 m de la base du tronc.

Les prélèvements ont été échelonnés tous les 2 mois pendant une durée de 18 mois, permettant ainsi d'effectuer un suivi saisonnier. Un intérêt particulier s'est porté sur les quatre périodes saisonnières importantes du cycle annuel des partenaires végétal et fongique :

- la période de reprise de croissance de l'arbre (printemps 1996),
- la période estivale (été 1996) pendant laquelle les deux partenaires de la symbiose montrent un fonctionnement équilibré (Prévost, 1992).
- La période automnale (automne 1996), époque de la fructification des champignons.
- la période de repos hivernal du végétal (hiver 1996),

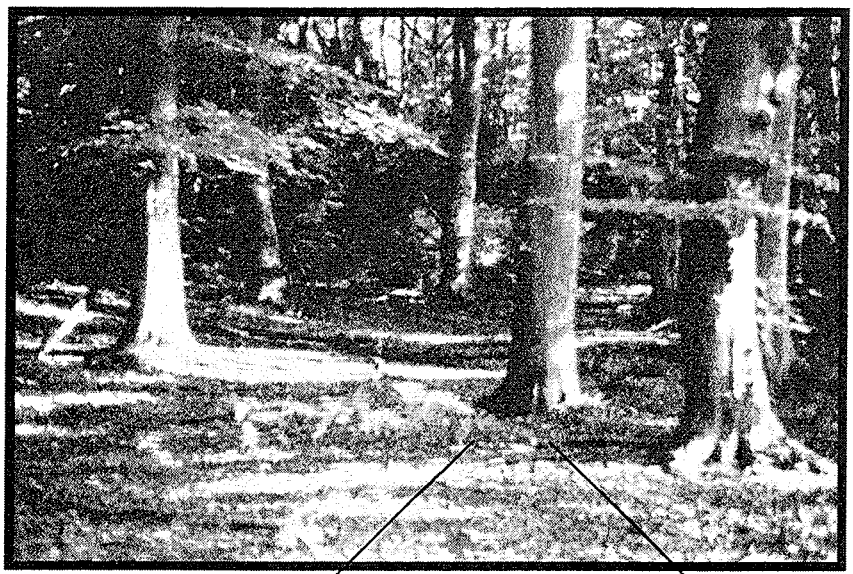
III. MESURE DU pH (eau) DU SOL

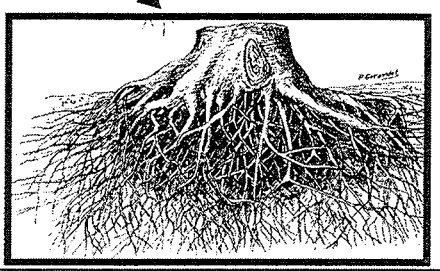
Le pH est mesuré sur le sol au voisinage des racines. Pour cela, 1 poids de litière ou de l'horizon A1, est mis en suspension dans 2,5 fois ce poids d'eau. Après 1 heure d'agitation, le pH est mesuré à l'aide d'un pHmètre.

IV. DOSAGE DES ELEMENTS TOTAUX ET DES PHOSPHATES SOLUBLES ET ECHANGEABLES

Un échantillon de chaque sol est mis à sécher à l'air libre pendant plusieurs jours. Après un tamisage à 2 µm, un broyage porphyre très fin est pratiqué de façon à éliminer les agrégats.

Deux techniques sont utilisées selon que les éléments totaux ou les éléments solubles et échangeables sont dosés.





Prélèvements de sol

Prélèvements d'organes biologiques sur le système racinaire du Hêtre.

Litière de feuilles de Hêtre

Horizon A1 organo-minéral

Mycorhizes de *Fagus sylvatica*

Racines porteuses de mycorhizes

Mycorhizes à *Cenococcum geophilum*

Mycorhizes à *Lactarius subdulcis*

Mesure du pH (eau) du sol

Préparation pour les microscopies photonique et électronique

Figure 14 : Visualisation des différents prélèvements effectués.

A. LES ELEMENTS TOTAUX

Les éléments totaux sont dosés par spectrométrie d'émission plasma à couplage inductif (méthode ICP = Inducted Coupled Plasma) après mise en solution de l'échantillon de sol par fusion au métaborate de lithium (fusion alcaline).

Cent milligrammes de chaque sol sont mélangés séparément avec 1 g de métaborate de lithium et broyés très finement. Après homogénéisation, le mélange est porté à 1100°C dans la chambre d'un four à l'abri de l'air. Après 5 min de fusion, la « perle » obtenue est coulée dans un bêcher contenant une solution nitrique (1 ml de HNO_3 65% pour 100 ml d'eau), préalablement chauffée à 80°C.

Le mélange est ensuite agité pendant 30 min de façon à obtenir une dissolution intégrale puis les éléments totaux sont dosés par la méthode ICP. Les résultats sont exprimés en ‰.

B. LES PHOSPHATES SOLUBLES ET ECHANGEABLES

Parmi les éléments solubles et échangeables, le dosage du phosphore, qui est un élément minéral souvent limitant pour la croissance végétale, a été privilégié.

Trois grammes de sol sec sont mis en suspension dans 30 ml d'eau désionisée et dans 30 ml de $CaCl_2$ 0,1M. Après agitation pendant 2 heures, le mélange est centrifugé à 4500 t/mn, puis filtré (diamètre des pores : 0,45 µm).

Le dosage s'effectue par chromatographie ionique (système DIONEX series 2000I). Deux colonnes anioniques sont couplées : une colonne AG4A-SC et AS4A-SC. Les colonnes sont éluées avec une combinaison de deux éluants : le carbonate de sodium à 1,7 mM et le bicarbonate à 1,8 mM. Le volume d'injection dans l'appareil est de 50 µl.

Le dosage des ions est réalisé à la sortie de la colonne par détection conductimétrique après suppression chimique des ions de l'éluant.

V. PREPARATION DES ECHANTILLONS BIOLOGIQUES

Des portions de racines portant des mycorhizes sont prélevées dans la litière et l'horizon A1 du sol podzolique et de la rendzine. Après identification sous la loupe, les mycorhizes à *Lactarius subdulcis* et à *Cenococcum geophilum* ainsi que des portions de 1 à 2 mm de racines porteuses sont isolées et préparées en vue de leur étude en microscopie (figure 15).

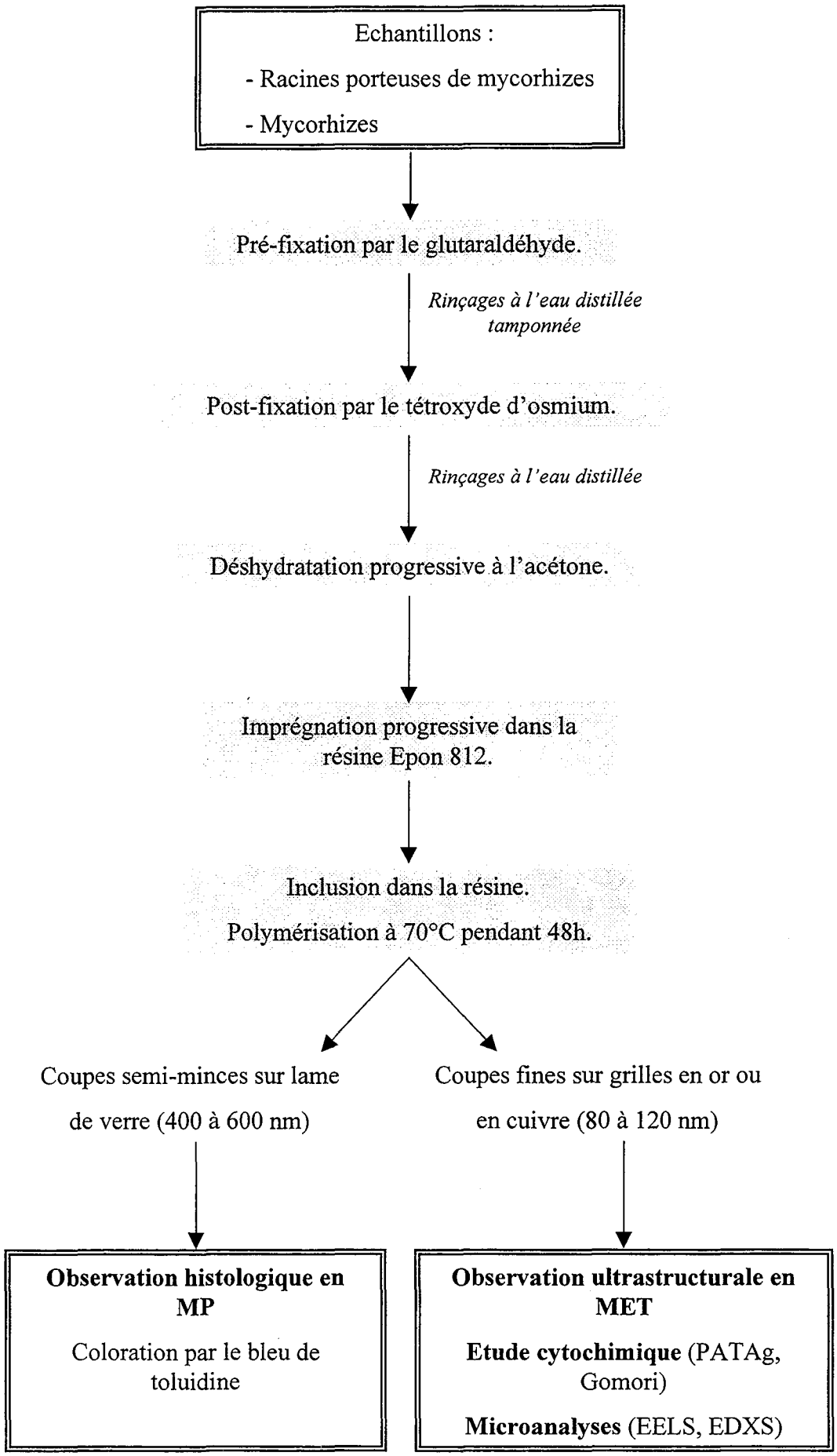


Figure 15 : Préparation des échantillons en vue de leur étude en microscopie photonique (MP) et en microscopie électronique à transmission (MET).

A. FIXATION CHIMIQUE

La double fixation par le glutaraldéhyde et le tétroxyde d'osmium permet de conserver l'ultrastructure cellulaire.

Les mycorhizes et les fragments de racines porteuses sont fixés chimiquement par le glutaraldéhyde à 2,5% dans du tampon cacodylate de sodium 0,1 M à pH 7,2 pendant 12 heures. Après trois lavages successifs de 5 minutes dans de l'eau distillée tamponnée, les objets sont post-fixés pendant 1 heure dans une solution tamponnée de tétroxyde d'osmium à 2%. Les échantillons sont ensuite soigneusement rincés à l'eau distillée.

B. DESHYDRATATION, IMPREGNATION ET INCLUSION

L'inclusion se faisant dans une résine hydrophobe, les objets sont d'abord déshydratés par de l'acétone.

La déshydratation se fait progressivement dans des bains d'acétone de concentration croissante : 10% (15 min), 20% (15 min), 40% (15 min), 60% (15 min), 80% (12 heures), 95% (1 heure), 100% (trois fois 15 min puis une fois 1 heure).

Les mycorhizes et les racines porteuses sont alors progressivement imprégnées par des passages successifs dans un mélange acétone-résine Epon 812 de concentration croissante en résine (tableau 1), puis incluses dans la résine pure dont la composition est donnée dans le tableau 2. L'imprégnation des échantillons par la résine est améliorée par un passage sous vide.

Après orientation des objets en vue de l'obtention de coupes tranversales et longitudinales, les inclusions sont mises à polymériser pendant 48 heures à 70°C.

Tableau 1 : Composition des mélanges résine/acétone (v/v) effectués lors de l'imprégnation des échantillons par la résine Epon 812.

N° de bains	1	2	3	4	5	6
Résine Epon	1/5	2/5	2,5/5	3/5	4/5	1
Acétone	4/5	3/5	2,5/5	2/5	1/5	0
Durée (jour)	4	4	4	4	4	2

Tableau 2 : Composition de la résine d'inclusion Epon 812.

CONSTITUANT	VOLUME (ml)
TAAB 812 (Epon)	9,10
DDSA (anhydre dodécénylsuccinique)	6,20
MNA (anhydre méthylnadique)	4,70
DMP30 (2-4-6 trisméthylaminométhylphénol)	0,35

C. Realisation des coupes

Après polymérisation, les blocs sont taillés à la lame de rasoir afin d'isoler l'échantillon au sommet d'une pyramide tétraédrique tronquée. La réalisation des coupes est effectuée sur un ultramicrotome RMC (modèle MT-7) à l'aide d'un couteau de diamant (Drukker).

- Des coupes semi-minces (400 à 600 nm) sont recueillies sur des lames de verre en vue de leur observation en microscopie photonique.
- Des coupes fines (80 à 90 nm) sont recueillies sur des grilles en or. Elles permettront l'étude ultrastructurale et cytochimique des échantillons en microscopie électronique à transmission.
- Des coupes fines (110 à 120 nm) sont également récoltées sur des grilles en cuivre pour être étudiées par des techniques microanalytiques qui seront exposées ultérieurement.

D. Observations en microscopie photonique

La coloration par le bleu de toluidine est une coloration topographique qui contraste l'ensemble des tissus fongiques et racinaires, permettant ainsi l'étude anatomique des racines et des mycorhizes, préalable à leur étude ultrastructurale. En effet, une observation au microscope photonique permet d'avoir une vue générale des tissus et d'apprécier l'état physiologique des divers organes.

Les coupes semi-minces sont recueillies sur lame de verre et sont colorées par le bleu de toluidine à 1% dans 2,5% de Na_2CO_3 (pH 11,6).

Une goutte de la solution de coloration est déposée sur les coupes. Le colorant est ensuite évaporé à chaud sur une plaque chauffante pendant 1 minute puis les lames sont rincées à l'eau. Les coupes sont alors observées au microscope photonique à contraste de phase (Zeiss).

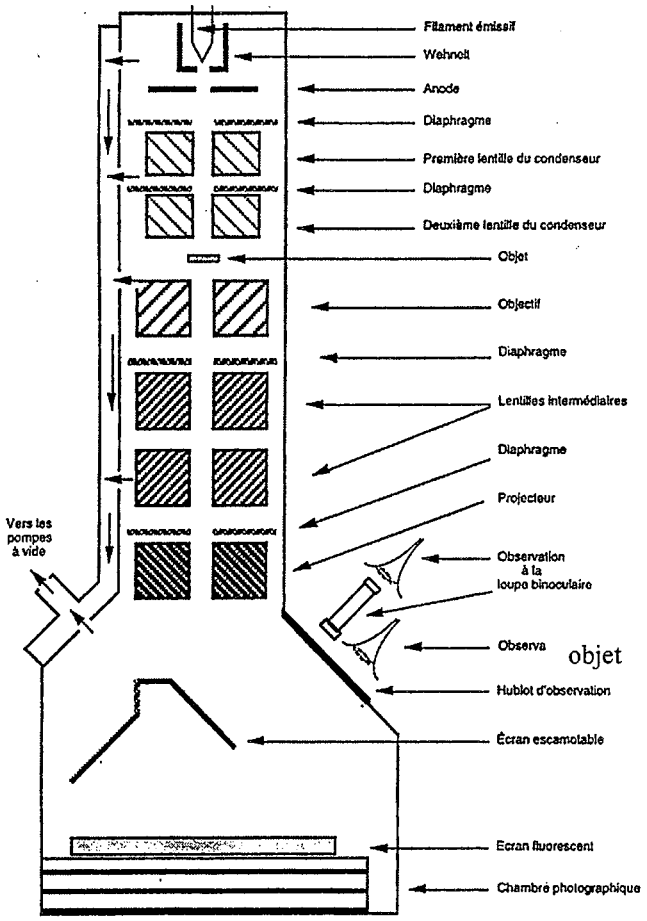


Figure 16 : Différents éléments et principe d'un microscope électronique à transmission.

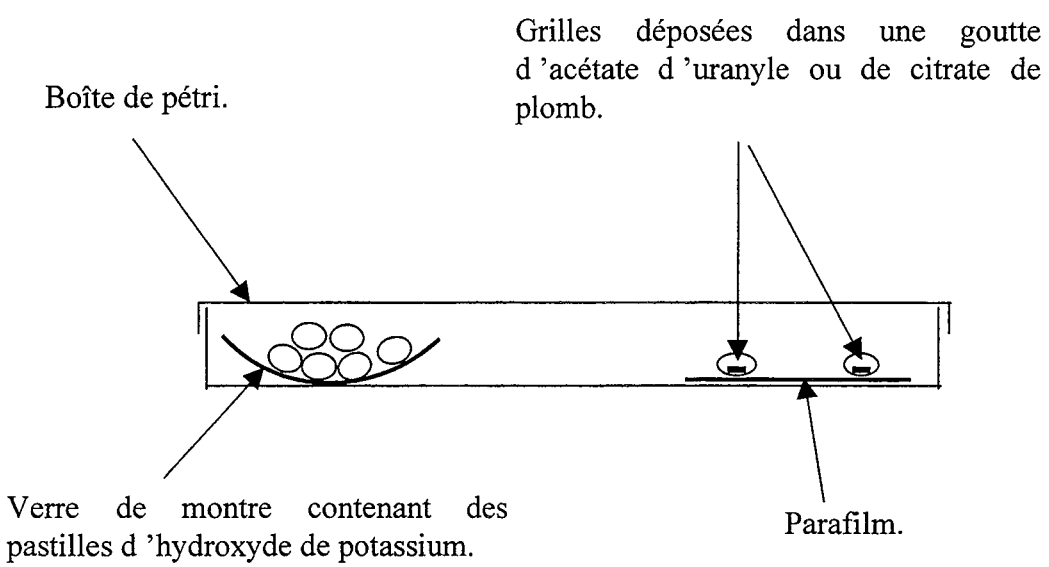


Figure 17 : Dispositif du double marquage par l'acétate d'uranyle et le citrate de plomb.

E. OBSERVATIONS EN MICROSCOPIE ELECTRONIQUE A TRANSMISSION

Trois types d'études ont été réalisées en microscopie électronique à transmission : des observations ultrastructurales, une étude cytochimique et la détermination de la microlocalisation de certains éléments par microanalyse.

1. Etude ultrastructurale

L'ultrastructure des mycorhizes et des racines porteuses est réalisée par l'observation des coupes fines en microscopie électronique à transmission. Cette étude a été effectuée sur un échantillonnage de 10 à 20 mycorhizes ou racines porteuses pour chaque sol et à chaque saison.

a. Observation ultrastructurale

Le faisceau d'électrons incident qui traverse l'échantillon est plus ou moins dévié par les molécules qu'il rencontre. L'angle de diffusion (θ) est corrélé au numéro atomique (Z) des atomes par la relation suivante :

$$\theta = Z^2 / E^2$$

où E représente l'énergie du faisceau électronique incident. Il est exprimé en kV.

Selon cette relation, les éléments possédant un numéro atomique élevé (les éléments lourds) provoquent une déviation plus importante des électrons du faisceau que les éléments légers de faible numéro atomique.

Le diaphragme situé après l'échantillon (figure 16) permet d'arrêter les électrons ayant diffusé avec un angle élevé, alors que les électrons qui ont faiblement diffusé ne sont pas arrêtés. Ce sont eux qui viennent frapper l'écran fluorescent. Ils apparaissent clairs alors que les éléments lourds sont visibles sous la forme de zones sombres.

b. Traitement des coupes

Afin d'améliorer le contraste, les coupes fines sont soumises à double marquage acétate d'uranyle-citrate de plomb non spécifique.

Les coupes sont recueillies sur des grilles en or, puis contrastées pendant 20 minutes par de l'acétate d'uranyle selon la technique de Valentines (1961). Après un rinçage soigneux à l'eau distillée, elles sont traitées pendant 20 minutes par le citrate de plomb selon la méthode de Reynolds (1963).

Ces différentes opérations se déroulent dans une enceinte confinée dont l'atmosphère est débarrassée du dioxyde de carbone qui tend à précipiter le plomb (figure 17). Pour cela, les grilles

sont placées dans une boîte de pétri en présence de pastilles d'hydroxyde de potassium déposées dans un verre de montre, à côté des grilles. Les grilles sont ensuite rincées longuement à l'eau distillée, puis mises à sécher sur du papier Joseph.

Elles peuvent alors être observées à l'aide d'un microscope électronique à transmission de marque Zeiss (modèle 902). Il fonctionne à 80 kV et permet de travailler à des grandissements allant de 3 000 à 140 000, avec une résolution de l'ordre du nm.

2. Etude cytochimique

a. Marquage des polysaccharides par le test PATAg

Ce test mis au point par Thiery (1967) met en évidence les polysaccharides en liaison α(1-4) ou β(1-4). L'acide périodique, par une oxydation ménagée, ouvre le cycle osidique au niveau des vic-glycols (carbones en liaison 2-3) en faisant apparaître deux fonctions aldéhyde qui sont visualisées par le thiocarbohydrazide associé au protéinate d'argent (Thiery et Rambourg, 1974).

Les coupes fines (80 à 90 nm), recueillies sur des grilles en or, subissent une oxydation par l'acide périodique à 1% pendant 30 minutes. Après rinçage dans l'eau distillée, elles sont recouvertes par une solution de thiocarbohydrazide à 0,2% dans l'acide acétique à 20% pendant 5 heures. Les grilles sont alors rincées par de l'acide acétique de concentration décroissante (20%, 15%, 10%, 5%) à raison de deux bains de 5 minutes pour chaque concentration, puis à l'eau distillée dans deux bains successifs. Les coupes sont ensuite mises en contact avec une solution de protéinate d'argent à 1% dans de l'eau distillée, pendant 30 minutes, à l'obscurité, avant d'être soigneusement rincées à l'eau distillée. Les grilles sont alors mises à sécher sur du papier Joseph.

Les polysaccharides ainsi marqués par l'argent apparaissent sous forme de précipités sombres en microscopie électronique à transmission.

Parallèlement à ce test, un témoin est réalisé par l'oxydation de coupes par l'eau oxygénée à 10% pendant 30 minutes (Roland et Vian, 1991). L'action de l'eau oxygénée ne permet pas de démasquer les groupements vic-glycols des chaînes carbonées. Puis les grilles sont traitées selon le protocole décrit précédemment.

b. Mise en évidence des protéines riches en cystine par la technique de Swift

La réaction de Swift (1968) est l'adaptation, pour la microscopie électronique à transmission, de la technique de Gomori (1946) utilisée en microscopie photonique. Elle permet de mettre en évidence les protéines riches en cystine.

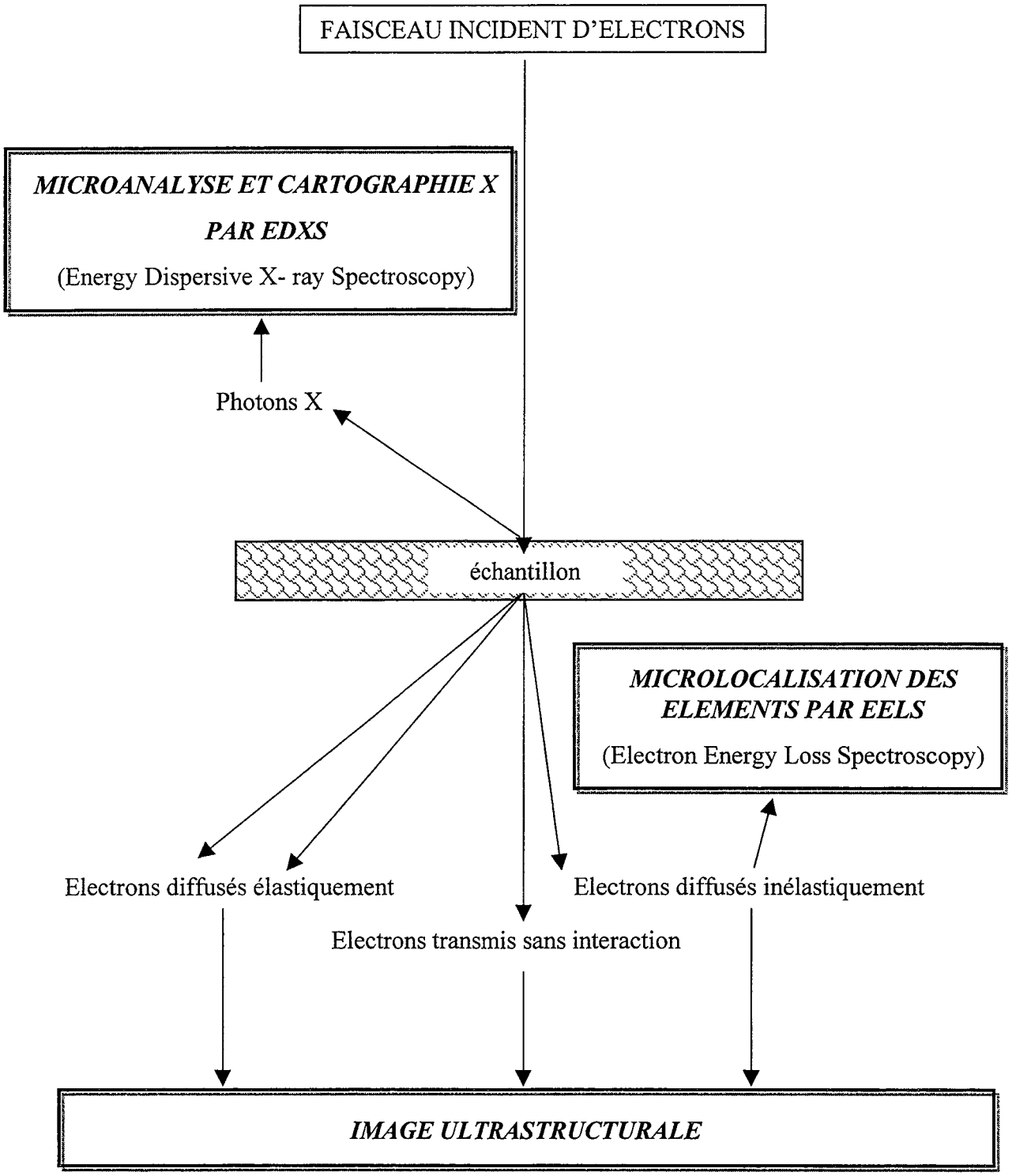


Figure 18 : Différentes observations et microanalyses des échantillons réalisées en microscopie électronique à transmission.

Le réactif de Swift étant instable, il se prépare extemporanément. Il se compose du mélange de deux solutions A et B dont la composition est la suivante :

★ 25 ml de la solution A :

méthénamine 3%	:	100 ml
nitrate d'argent 5%	:	5 ml

★ 5 ml de la solution B :

acide borique 1,44%	:	10 ml
borax 1,9%	:	100 ml

★ 25 ml d'eau distillée

Les coupes fines (80 à 90 nm), recueillies sur des grilles en or, sont immergées dans le mélange réactif contenu dans des tubes à hémolyse. Les tubes, entourés de papier aluminium et bouchés, sont placés dans un bain-marie à 45°C, pendant 60 minutes. Après deux rinçages soigneux à l'eau distillée, les grilles sont mises à sécher sur du papier Joseph.

L'observation de ces coupes en microscopie électronique à transmission montre des protéines associées à l'argent, visibles sous forme de précipités sombres.

Pour les deux types de tests cytochimiques, une échelle arbitraire a été choisie et représente l'intensité de la réaction :

-	:	réaction négative
(+)	:	très faible réaction
+	:	réaction de faible intensité
+(+)	:	réaction d'intensité moyenne
++	:	réaction de forte intensité
+++	:	réaction de très forte intensité

F. TECHNIQUES DE MICROANALYSE

Les techniques microanalytiques permettent de cytolocaliser des éléments dans les tissus biologiques. Lors de mon travail, ces techniques ont été utilisées pour localiser le calcium, le silicium, l'azote, le phosphore dans les différentes cellules fongiques et végétales qui composent les tissus des organes mycorhiziens et racinaires.

L'étude analytique a été réalisée sur une moyenne de 3 à 5 échantillons pour chaque sol et pour chaque saison.

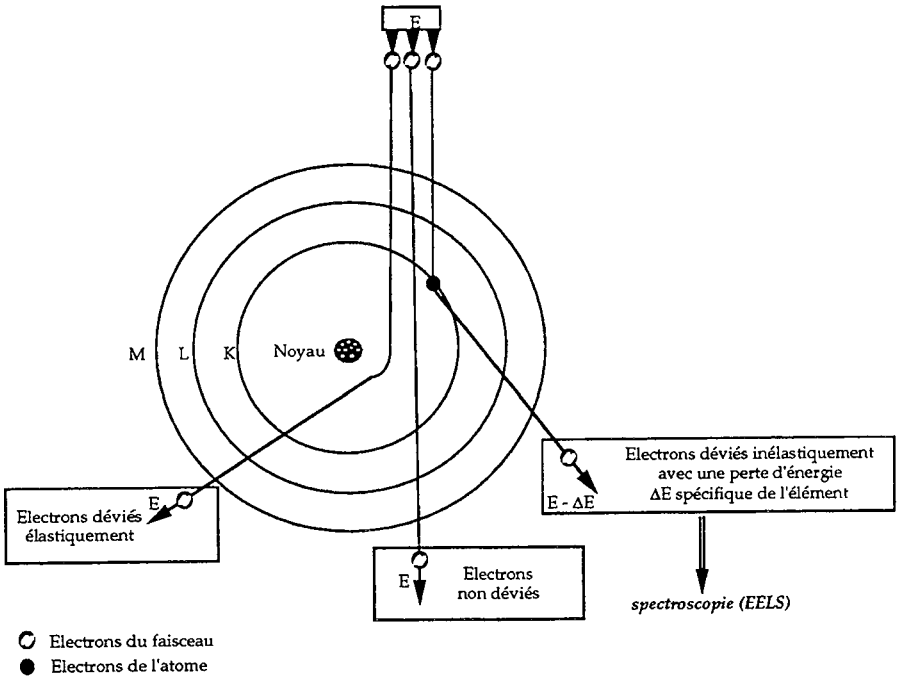


Figure 19 : Schéma du noyau et des couches électroniques d'un atome. Lorsque le faisceau incident traverse l'échantillon, les électrons peuvent être : non déviés, déviés élastiquement ou déviés inélastiquement. Dans ce dernier cas, les électrons déviés subissent une perte d'énergie caractéristique de l'atome. Cette perte d 'énergie des électrons est utilisées en spectroscopie (EELS).

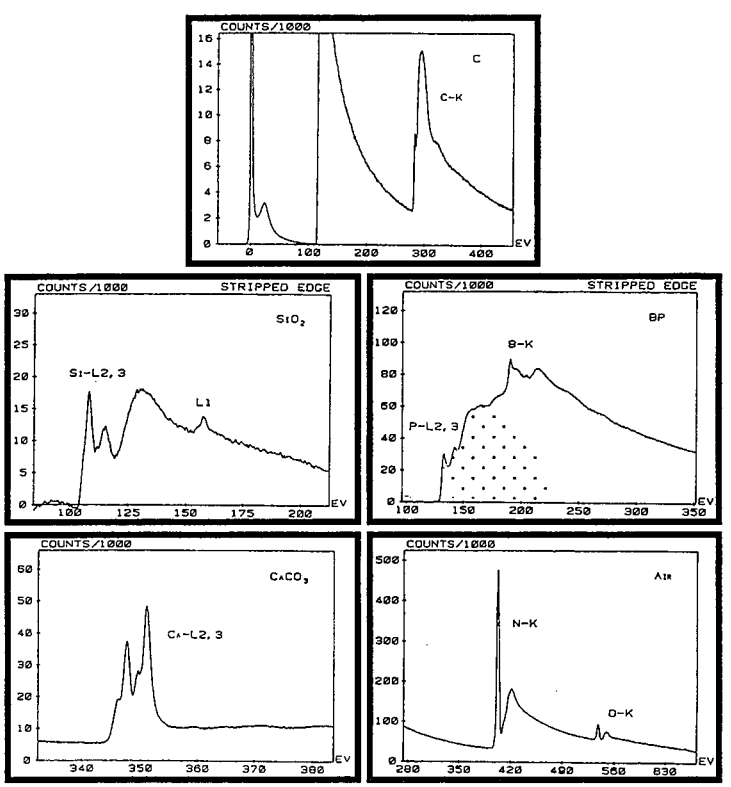


Figure 20 : Pics de pertes d'énergie caractéristiques des différents éléments recherchés (d'après EELS Atlas, 1983).

En raison de leur complémentarité, deux techniques spectroscopiques ont été utilisées simultanément. De plus, l'analyse par imagerie permet d'illustrer la répartition spatiale de l'élément recherché.

Les différentes observations et microanalyses menées sur les coupes de mycorhizes et de racines porteuses sont résumées dans la figure 18.

1. Spectroscopie par pertes d'énergie des électrons transmis (Electron Energy Loss Spectroscopy ou EELS)

Cette technique apporte des informations sur la composition élémentaire des échantillons non contrastés (Colliex *et al.*, 1984).

Elle utilise la perte d'énergie que subissent certains électrons du faisceau incident, qui interagissent avec ceux de l'échantillon (Reimer, 1995). En effet, lorsque le faisceau d'électrons incident traverse les atomes de la préparation, il peut se produire 3 cas de figure (figure 19) :

- les électrons traversent l'atome sans interagir avec celui-ci,
- les électrons interagissent avec le noyau de l'atome. Ils sont déviés par celui-ci sans subir de perte d'énergie. C'est la déviation élastique,
- les électrons du faisceau interagissent avec les électrons de l'atome. Dans ce cas, les électrons du faisceau sont déviés et subissent une certaine perte d'énergie. C'est la déviation inélastique. Cette perte d'énergie est caractéristique de l'atome traversé. C'est ainsi que le calcium présente deux pics de pertes d'énergie caractéristiques, localisés à 346,4 eV et 355 eV. Le pic de pertes d'énergie de l'azote se situe à 401,6 eV, celui du phosphore à 132,2 eV et celui du silicium à 99,2 eV (figure 20).

Les coupes fines (110 à 120 nm) sont analysées à l'aide du microscope électronique Philips CM20 TEM/STEM, en mode TEM, opérant à 200 kV et équipé d'un spectromètre de pertes d'énergie 666 Gatan et connecté à un MacIntosh contrôlé par le logiciel EL/P 2.1. Le diaphragme d'entrée du spectromètre, le demi-angle de collection et la dispersion sont respectivement 2 mm, 10 mRad et 0,2 eV/canal.

Les analyses ont été effectuées dans des conditions similaires nous permettant ainsi de réaliser une échelle arbitraire qui tient compte à la fois de l'échelle du spectre et de la hauteur des pics :

no : non observé
\- : teneur inférieure au seuil de détection de l'appareil
(+) : très faible accumulation
\+ : faible accumulation

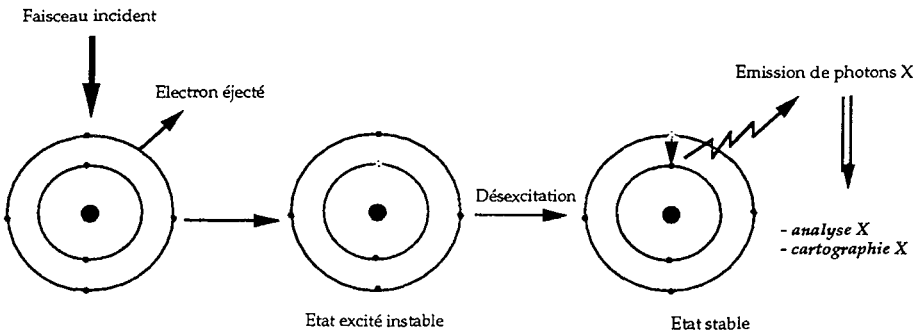


Figure 21 : Principe de la technique microanalytique de la dispersion d'énergie des photons X (EDX pour Energy Dispersive X ray Spectroscopy). Exemple de l'émission de photons X par un atome de carbone. La microanalyse X permet d'identifier l'ensemble des atomes présents dans une zone donnée, la cartographie X donne la distribution spatiale d'un élément déterminé. Les électrons du faisceau incident peuvent arracher un électron des couches profondes de l'atome qui se trouve alors dans un état instable. Un électron de la couche supérieure vient alors combler l'espace vide. Ce déplacement électronique s'accompagne de l'émission de photons X qui sont utilisés pour la microanalyse et la cartographie X.

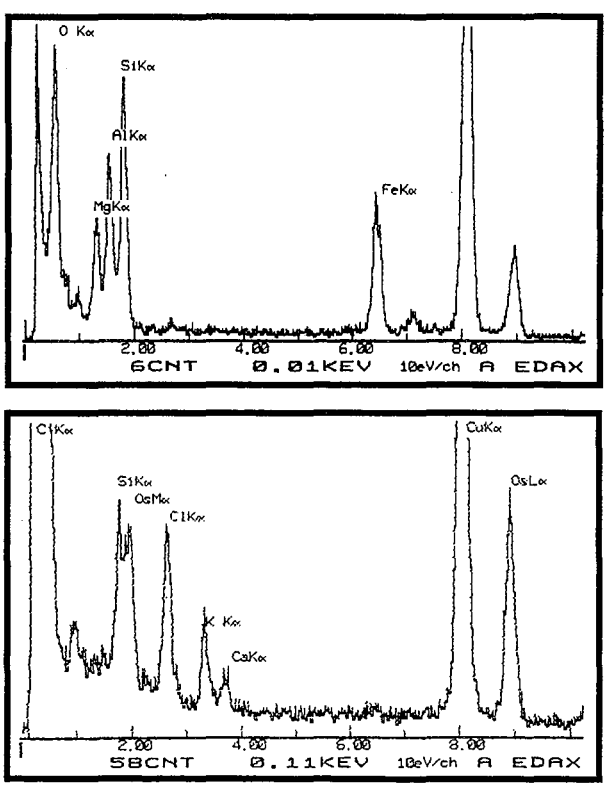


Figure 22 : Pics caractéristiques quelques éléments en microanalyse X.

+(+) : accumulation moyenne

++ : forte accumulation

+++ : très forte accumulation

2. Microanalyse des rayons X (Energy Dispersive X-ray Spectroscopy ou EDXS)

Elle permet d'identifier l'ensemble des atomes présents dans la zone analysée (environ 2 nm).

Le principe de cette technique microanalytique, illustré dans la figure 21, est basé sur le fait qu'un faisceau électronique incident possède une énergie suffisante capable d'éjecter des électrons situés dans la couche la plus proche du noyau. La molécule est alors dans un état excité instable. Un électron de la couche supérieure va alors venir occuper la place libérée par l'électron éjecté. Lors de la désexcitation de la molécule, l'excès d'énergie est libéré sous forme de photons X dont l'énergie est spécifique de l'atome concerné.

La microanalyse X des coupes fines (110 à 120 nm) par la technique de dispersion des énergies des photons X a été réalisée avec un microscope électronique Philips CM20 TEM/STEM, en mode TEM (sonde de 2 nm) assisté par le logiciel EDAX 9900.

La figure 22 illustre les pics caractéristiques de quelques éléments en microanalyse X.

3. Analyse par imagerie filtrée (la cartographie X)

La cartographie X permet d'obtenir la distribution spatiale de l'élément recherché. Cette technique d'imagerie utilise l'émission spécifique de photons X par l'atome considéré. En effet, l'image est formée à l'aide de ces photons émis qui apparaissent sous la forme de spots blancs.

La cartographie X d'un élément donné est obtenue à l'aide du microscope électronique Philips CM20 TEM/STEM, placé en mode STEM.

CHAPITRE I :

CARACTERISATION DES MODELES MYCORHIZIENS ET DE LEURS RACINES PORTEUSES PENDANT LA PERIODE ESTIVALE SUR LA RENDZINE BRUNIFIEE.

INTRODUCTION :

La première partie de ce travail a pour but de définir des modèles mycorhiziens naturels, qui serviront de référence pour l'étude ultérieure de l'influence du sol et des saisons sur le comportement des partenaires de la symbiose mycorhizienne et plus particulièrement sur celui du champignon.

I. FACTEURS DE VARIATION DE LA MYCORHIZATION

Le système racinaire des végétaux ligneux peut être plus ou moins colonisé par de nombreux champignons aboutissant à des associations mycorhiziennes très différentes.

A. VARIATION DUE A L'AGE DE LA PLANTE HOTE

Un des facteurs responsables de la variabilité du cortège mycorhizien sur un système racinaire est l'âge de l'hôte.

Mason *et al.* (1982) et Deacon *et al.* (1983) ont ainsi déterminé une succession mycorhizienne en faisant un relevé des carpophores. Certains champignons colonisent le système racinaire de jeunes plants (champignons précoces) pendant quelques années puis disparaissent alors que de nouveaux champignons se développent (champignons tardifs). *Hebeloma crutuliniforme*, *Hebeloma sacchariolens*, *Laccaria proxima*, *Laccaria tortilis* et *Telephora terrestris* sont ainsi considérés comme des champignons précoces, alors que *Lactarius glyciosmus*, *L. pubescent*, *Cortinarius* sp., *Russula betularum* et *R. grisea* sont des champignons tardifs. De même, Lunt *et al.* (1994) ont étudié la colonisation par les champignons de plantules de *Quercus* ainsi que celle d'arbres âgés de 5, 6 et 14 ans et ont constaté une augmentation du nombre d'espèces mycorhiziennes avec la maturation des arbres.

B. VARIATION DUE AU PARTENAIRE FONGIQUE

Il existe plusieurs causes potentielles pour expliquer la variation du cortège mycorhizien sur le système racinaire d'un arbre parmi lesquelles la quantité d'inocula dans le sol et la capacité d'infection (agressivité) des mycélia (Read *et al.*, 1992). De plus, les associations mycorhiziennes sont plus ou moins spécifiques. Ainsi, le spectre d'action des champignons ectomycorhiziens est relativement vaste et la relation qui unit les deux symbiotes dans une telle

mycorhize est peu spécifique à de rares exceptions près comme *Boletus elegans* qui ne s'associe qu'avec le Mélèze (Boullard, 1990).

Outre l'aptitude à l'infection, l'ultrastructure des organes mycorhiziens est également en grande partie conditionnée par le partenaire fongique associé. Ainsi, sur un même système racinaire, dans le même écosystème, peuvent cohabiter des ectomycorhizes et des endomycorhizes (Moyersoen *et al.*, 1998). Les ectomycorhizes développent un manteau fongique tout autour de la racine courte, puis s'établit un réseau de Hartig intercellulaire, alors que les endomycorhizes forment uniquement des structures intracellulaires. De plus, dans un même genre fongique, des modifications ultrastructurales de la mycorhize sont possibles. Ainsi, chez les lactaires, Prévost et Pargney (1995) ont décrit deux mycorhizes se différenciant notamment par leur manteau : celui des mycorhizes formées par *Lactarius blennius* est protégé en surface par un épais mucilage alors que chez les mycorhizes établies par *Lactarius subdulcis*, ce mucilage est absent. De même, des souches différentes d'*Hebeloma cylindrosporum* peuvent élaborer un réseau de Hartig différent : la souche sauvage met en place un réseau unisérié alors que la souche mutante surproductrice d'auxine établit un réseau de Hartig plurisérié (Gea, 1995 ; Le Disquet, 1997).

C. VARIATION DUE AUX CONDITIONS DU MILIEU

Les facteurs environnementaux peuvent influencer la colonisation et l'établissement des mycorhizes sur les racines des arbres (Stotzky, 1967 ; Danielson et Visser, 1989).

Les facteurs édaphiques les plus importants sont la disponibilité en nutriments, la température (Theodorou et Bowen, 1971 ; Parke *et al.*, 1983 ; Samson et Fortin, 1986) , le pH (Lehto, 1994) et l'humidité des sols (Theodorou, 1978 ; Bougher et Malajczuk, 1990).

II. LE CHOIX DES MODELES

Le Hêtre a été choisi comme partenaire végétal parce qu'il est capable de se développer dans des sites présentant des conditions pédologiques très différentes. De plus, son système racinaire est peu profond, ce qui facilite les prélèvements (Riedacker, 1981). D'autre part, il s'agit d'un arbre caducifolié, donc soumis à un arrêt du fonctionnement photosynthétique lors de la période hivernale.

Les modèles mycorhiziens retenus ont été choisis selon plusieurs critères. D'une part, leur identification est possible ce qui a permis de les différencier des autres mycorhizes tout au long de notre étude. D'autre part, leur appartenance taxonomique est différente et permettra de mettre

en évidence d'éventuelles modifications entre les champignons ascomycètes (*Cenococcum geophilum*) et basidiomycètes (*Lactarius subdulcis*). De plus, les lactaires sont considérés comme des champignons tardifs s'associant avec des systèmes racinaires âgés (Deacon *et al.*, 1983). *Cenococcum geophilum* appartiendrait plutôt aux champignons précoces élaborant des symbioses au niveau des systèmes racinaires jeunes ou au niveau des zones jeunes de systèmes racinaires plus âgés (Hilton *et al.*, 1989) bien que d'autres auteurs le considèrent davantage comme un champignon intermédiaire (Prévost, 1992).

Enfin, la richesse en ions calcium de la rendzine permettra d'étudier leur effet sur les mycorhizes puisque les ions calcium sont susceptibles d'être toxiques pour certains végétaux, lorsqu'ils sont en excès mais également en provoquant des carences secondaires en autres éléments minéraux (Fe, Mn, ...).

Tableau 3 : Dosage des éléments totaux effectué sur les deux sols étudiés par la méthode ICP (Inducted Coupled Plasma). Les valeurs sont exprimées en ‰.

Echantillon	P_2O_5	SiO_2	Al_2O_3	Fe_2O_3	MnO	MgO	CaO	NaO	K_2O	TiO_2	PF	Total
Rendzine brunifiée	1,79	525	99	48,1	1,15	8,89	26,8	8,4	20,6	7,0	253,6	1000
Sol podzolique	0,70	770	25	7,5	0,14	1,12	1,5	3,0	10,9	2,3	165,4	988

Tableau 4 : Dosage des phosphates solubles et échangeables par la méthode de chromatographie ionique. Les valeurs sont exprimées en mg / l.

Echantillon	HPO_4^{2-} soluble	HPO_4^{2-} échangeable
Rendzine brunifée	0,50	1,10
Sol podzolique	2,51	3,72

RESULTATS :

Afin de mettre en évidence d'éventuelles différences morphologiques, ultrastructurales et fonctionnelles au sein des mycorhizes étudiées et de leurs racines porteuses, il est nécessaire de décrire les modèles à un stade d'évolution servant de référence.

La période estivale étant particulièrement propice au bon fonctionnement des deux partenaires de la symbiose, les prélèvements estivaux ont été choisis en tant que référence (Prévost, 1992). De même, la rendzine brunifiée constituant un sol relativement riche en éléments minéraux totaux (tableau 3), a été retenue comme substrat de référence. L'importance du phosphore dans les sols nous a conduit à effectuer le dosage des phosphates solubles et échangeables présents dans les sites étudiés (tableau 4).

Une étude préliminaire sur les deux mycorhizes et leurs racines porteuses, prélevées dans la litière et dans l'horizon A1, n'a pas révélé de différences entre les deux zones de prélèvement, les résultats énoncés concerneront donc l'ensemble des échantillons sans faire de distinction.

I. ETUDE MORPHOLOGIQUE

L'observation à la loupe binoculaire permet la caractérisation morphologique des types mycorhiziens et des racines étudiés.

A. LES MYCORHIZES DE *CENOCOCCUM GEOPHILUM*

Les mycorhizes à *Cenococcum geophilum* se caractérisent par leur couleur noir charbon et par un mycélium extramatriciel bien développé (Planche I, Fig. 1). Elles ont une taille réduite (1 mm en moyenne), sont isolées et peu ramifiées. Elles dominent par leur nombre dans l'ensemble des mycorhizes du système racinaire du Hêtre.

B. LES MYCORHIZES DE *LACTARIUS SUBDULCIS*

Ces mycorhizes de couleur jaune orangé, sont dépourvues de mycélium extramatriciel (Planche II, Fig. 1) et sont facilement repérables à l'œil nu puisqu'elles ont une taille de l'ordre de 5 mm. Elles sont rares et sont toujours très ramifiées.

C. LES RACINES PORTEUSES DE MYCORHIZES DE *FAGUS SYLVATICA*

Les racines porteuses de mycorhizes latérales ont été prélevées dans le but d'étudier leurs structures ainsi que le devenir des éléments transmis par la mycorhize au reste du système racinaire.

Ces racines ont été prélevées en amont des mycorhizes. Elles sont de couleur brune et ne présentent pas de poils absorbants (Planche III, Fig. 1). Du mycélium est parfois présent en surface.

II. ETUDE HISTOLOGIQUE

L'étude de coupes histologiques menée en microscopie photonique permet de définir l'organisation interne des organes examinés. Cette étude porte plus particulièrement sur la partie sub-apicale des mycorhizes considérée comme la zone symbiotique fonctionnelle (Lei, 1988).

A. LES MYCORHIZES DE *CENOCOCCUM GEOPHILUM*

L'observation des coupes en microscopie photonique montre une organisation ectomycorhizienne typique. Le manteau, (Planche I, Fig. 2 et 3), est composé de quatre à cinq couches d'hyphes, dont les plus externes sont recouvertes par un matériel dense et épais pouvant correspondre à du mucilage. Le manteau entoure l'apex racinaire (Planche I, Fig. 2). Le réseau de Hartig, (Planche I, Fig. 2 et 3), continu et unisérié, s'étend sur une à deux assises de cellules corticales.

L'endoderme, (Planche I, Fig. 2 et 4), reconnaissable à l'accumulation de composés polyphénoliques dans certaines de ses cellules, délimite intérieurement le cortex. Au centre de la racine, (Planche I, Fig. 4), le cylindre central ne renferme que des structures primaires.

B. LES MYCORHIZES DE *LACTARIUS SUBDULCIS*

Les ectomycorhizes à *Lactarius subdulcis* présentent un manteau pseudoparenchymateux épais (pouvant être constitué de plus d'une dizaine d'assises cellulaires) et dépourvu de mucilage en surface (Planche II, Fig. 2). Le manteau renferme des laticifères (Planche II, Fig. 3). Ces structures caractéristiques des lactaires jouent un rôle dans

la production et la conduction de latex. La limite inférieure du manteau est marquée par des plages sombres de composés polyphénoliques (Planche II, Fig. 2, 3 et 4).

Dans le cortex, (Planche II, Fig. 2), le champignon est en position intercellulaire où il forme un réseau de Hartig unisérié et continu sur deux assises de cellules corticales. Toutefois, vers la partie basale des mycorhizes, il peut devenir plurisérié. Les cellules corticales voisines du réseau de Hartig accumulent des composés polyphénoliques denses et sombres (Planche II, Fig. 3).

Le cortex interne dépourvu de champignon en juillet est limité intérieurement par l'endoderme riche en composés polyphénoliques denses (Planche II, Fig. 5). Le cylindre central réduit ne présente pas de formations secondaires (Planche II, Fig. 5).

Ces ectomycorhizes présentent la particularité d'être souvent associées à un champignon ascomycète. Celui-ci, reconnaissable aux corps de Woronin bordant les septums et à sa taille importante (Planche II, Fig. 4), est présent dans le manteau entre les hyphes du lactaire et dans le cortex racinaire en position intracellulaire (Planche II, Fig. 2). Il a été également observé dans les cellules tanifères de la coiffe.

C. LES RACINES PORTEUSES DE MYCORHIZES DE *FAGUS SYLVATICA*

Les racines porteuses de mycorhizes sont parfois recouvertes de mycélium qui ne s'organise toutefois pas en un manteau continu comme dans le cas de la mycorhize (Planche III, Fig. 2).

L'observation de coupes en microscopie photonique montre un cortex en voie de dégénérescence formé de quatre à cinq couches de cellules envahies d'hyphes. L'endoderme dépourvu de champignon contient en abondance des composés polyphénoliques sombres et denses (Planche III, Fig. 2).

Le cylindre central renferme des formations secondaires (Planche III, Fig. 2). Le cambium a produit du xylème et du phloème secondaires. De même, le phellogène qui s'est différencié dans le péricycle assure la mise en place du suber. Celui-ci, en cours de différenciation, n'est formé que d'une à deux couches de cellules.

III. ETUDE ULTRASTRUCTURALE

L'étude ultrastructurale permet de définir, à l'échelle sub-cellulaire, les structures impliquées dans le transfert et le stockage des éléments minéraux au sein des mycorhizes et

des racines porteuses. Cette étude permet également d'observer des variations de ces structures d'un type mycorhizien à l'autre.

A. LES MYCORHIZES DE *CENOCOCCUM GEOPHILUM*

La surface de la mycorhize est recouverte d'un matériel mucilagineux (Planche IV, Fig. 1).

Les hyphes du manteau sont vacuolisées et possèdent un cytoplasme dense (Planche IV, Fig. 1) renfermant notamment des mitochondries. Ces hyphes, le plus souvent jointives, sont liées entre elles par un ciment dense pouvant être abondant par endroits (Planche IV, Fig. 1). Les vacuoles renferment de petits granules sombres (Planche IV, Fig. 2). La présence de corps de Woronin, (Planche IV, Fig. 3), au niveau des interruptions septales confirme l'appartenance taxonomique de *Cenococcum geophilum* à la classe des Ascomycètes. La limite entre le manteau le plus interne et les cellules corticales est marquée par la présence de plages sombres de composés polyphénoliques (Planche IV, Fig. 1). Ces plages peuvent présenter un aspect strié ou non.

Les hyphes du réseau de Hartig présentent une ultrastructure comparable à celle des hyphes du manteau (Planche IV, Fig. 4). Toutefois, l'aspect des granules vacuolaires est différent. En effet, des globules de taille plus importante et de contour irrégulier sont visibles dans les vacuoles (Planche IV, Fig. 4).

Les cellules du cortex profond sont de grande taille et peuvent produire des composés polyphénoliques denses d'apparence globuleuse qui s'accumulent le long du tonoplaste (Planche IV, Fig. 5). Les jonctions cellulaires localisées entre ces cellules sont réduites. Les cellules endodermiques possèdent une vacuole volumineuse remplie de polyphénols. Ces cellules présentent des épaississements pariétaux internes importants mais peu contrastés.

Le cylindre central comprend les vaisseaux xylémiens à paroi secondaire claire, épaisse (Planche IV, Fig. 6) et interrompue par des ponctuations. La face interne de cette paroi est bordée par un liseré fin et sombre. Les cellules du parenchyme médullaire ont une paroi fine et renferment des organites cytoplasmiques (mitochondries, ...).

B. LES MYCORHIZES DE *LACTARIUS SUBDULCIS*

Chez les jeunes mycorhizes de lactaire (données non montrées), il est possible d'observer un manteau divisé en trois zones. Un manteau externe mort, un manteau interne vivant et un manteau intermédiaire constitué d'hyphes également vivantes reliées entre elles

par un ciment relativement abondant. Les hyphes du manteau intermédiaire se caractérisent également par la présence d'un plus grand nombre de globules vacuolaires que dans le manteau interne.

L'étude des mycorhizes matures et fonctionnelles a été privilégiée. Le manteau des ectomycorhizes de *Lactarius subdulcis* matures, (Planche V, Fig. 1), se compose généralement de deux zones bien distinctes. Un manteau externe constitué d'hyphes mortes, d'assez grande taille et liées entre elles par un ciment fin. Le manteau interne est formé d'hyphes vivantes. Le ciment interhyphal est généralement réduit mais il peut être abondant à certains endroits. Les vacuoles des hyphes du manteau interne renferment des globules sombres volumineux ainsi que des granules de taille beaucoup plus réduite et à contours réguliers (Planche V, Fig. 2). Des dolipores observés au niveau des septums des articles mycéliens confirment l'appartenance de ce champignon à la classe des Basidiomycètes (Planche V, Fig. 3). Des plages sombres polyphénoliques, (Planche V, Fig. 3), sont visibles dans le ciment du manteau interne. Elles sont plus généralement observées à la limite entre le manteau interne et les cellules corticales. Des cellules fongiques volumineuses, (Planche V, Fig. 4), renfermant un contenu dense et sombre sont également observées dans le manteau interne. Elles correspondent à des laticifères caractéristiques des lactaires.

Le champignon ascomycète associé à ce type de mycorhize, souvent observé dans le manteau, est reconnaissable par la présence des corps de Woronin, par la couche pariétale sombre qui le limite extérieurement et par la taille de ses hyphes qui peut être jusqu'à quatre fois plus importante que celle des hyphes du lactaire (Planche V, Fig. 5). Il peut renfermer des globules vacuolaires à contours flous (Planche V, Fig. 5).

Les hyphes formant le réseau de Hartig, (planche V, Fig. 6), présentent un aspect ultrastructural similaire à celui des hyphes du manteau interne. Des granules sont visibles dans de petites vacuoles des hyphes (Planche V, Fig. 6).

Les tissus racinaires (cortex, endoderme, cylindre central) impliqués dans les mycorhizes, (Planche V, Fig. 7 et 8), présentent les mêmes caractéristiques que celles des mycorhizes à *Cenococcum geophilum.*

C. Les racines porteuses de mycorhizes de *Fagus sylvatica*

Le cortex est formé de cellules dégénérescentes et souvent aplaties, (Planche VI, Fig. 1). Elles présentent un épaississement pariétal important et sont envahies de champignon dont les hyphes intracellulaires de petite section sont parfois vacuolisées (Planche VI, Fig. 1). Ces vacuoles peuvent renfermer de gros globules peu denses. Dans les situations favorables, il est

	CONSTITUANTS	NATURE CHIMIQUE	
		RENDZINE BRUNIFIEE	
		Polysaccharides	Protéines
Surface de la mycorhize	Mucilage	++	++
Manteau externe	Parois fongiques	+(+)	-
	Ciment	++	++
Manteau interne	Parois fongiques	+	+
	Ciment	++	++
	Glycogène	+++	-
Réseau de Hartig *ou* Hyphes intracellulaires	Parois fongiques	++	+
	Parois des cellules corticales voisines	(+)	-
	Ciment	+(+)	(+)
	Glycogène	+++	-
Cortex	Parois des cellules corticales	+	-
	Jonctions cellulaires	+	-
	Parois des cellules endodermiques	-	-
Cylindre central	Parois des cellules du péricycle	-	-
	Parois des cellules du parenchyme	++	+
	Jonctions cellulaires	++	+
	Parois lignifiées des vaisseaux	-	-
	Liseré interne des parois du xylème	++	++

Tableau 5 : Organisation et nature glycoprotéique des constituants formant les structures présentes dans les mycorhizes de *Fagus sylvatica* / *Cenococcum geophilum* prélevées en été dans la rendzine brunifiée.

possible de confirmer si le champignon intracellulaire est un Ascomycète ou un Basidiomycète, soit par l'aspect des septums, soit par la densité du ciment reliant les hyphes, qui est sombre dans le cas des Ascomycètes et clair dans celui des Basidiomycètes. Des composés polyphénoliques denses peuvent être observés dans les cellules du cortex.

Les cellules endodermiques ainsi que les cellules subéreuses sous-jacentes, (Planche VI, Fig. 2), présentent la particularité de posséder une couche sombre continue située contre la couche interne de leur paroi.

Dans le cylindre central, (Planche VI, Fig. 3, 4 et 5), des formations secondaires (phellogène, suber, cambium, xylème et phloème) sont visibles. Les vaisseaux du xylème secondaire sont de grande taille. Il est cependant possible d'observer des vaisseaux présentant des restes de cytoplasme renfermant des amyloplastes. De plus, les cellules du parenchyme possèdent une vacuole volumineuse qui accumule des composés polyphénoliques.

IV. ETUDE CYTOCHIMIQUE

L'étude des constituants polysaccharidiques et protéiques a été réalisée en microscopie électronique à transmission afin de déterminer une partie de la nature cytochimique des différentes structures mycorhiziennes et racinaires constitutives des organes étudiés.

A. LES MYCORHIZES DE *CENOCOCCUM GEOPHILUM*

Les résultats sont reportés dans le tableau 5 et illustrés dans les planches VII et VIII.

1. Le test PATAg

Ce test cytochimique de mise en évidence des polysaccharides permet une bonne amélioration du contraste des images.

Les hyphes extramatricielles, (Planche VII, Fig. 1), qui explorent le substrat, possèdent une paroi épaisse et très réactive.

Le mucilage, (Planche VII, Fig. 2), présent en surface des mycorhizes réagit fortement au test PATAg. Il en est de même pour le ciment interhyphal. La paroi des hyphes de la partie superficielle du manteau réagit plus faiblement (Planche VII, Fig. 2).

Dans la partie interne du manteau, (Planche VII, Fig. 3), les parois fongiques sont peu réactives alors que le ciment interhyphal est fortement marqué. Parmi les réserves fongiques cytoplasmiques, le glycogène, peu abondant, réagit fortement au PATAg. Il se présente sous

la forme de rosettes ou de petits globules, généralement repoussés en périphérie de la cellule par la vacuole (Planche VII, Fig. 1, 2, 3 et 4).

Au niveau du réseau de Hartig (Planche VII, Fig. 4), les parois fongiques sont moins réactives. La présence de glycogène dans le cytoplasme des hyphes est bien marquée. Concernant les cellules corticales voisines du réseau de Hartig, les parois cellulaires montrent une forte réaction au test PATAg. Le ciment reliant les deux partenaires est également bien marqué.

Les différentes structures du cortex (parois des cellules corticales et méats) présentent une réaction similaire faible (Planche VII, Fig. 5). En revanche, une réponse négative a été observée au niveau des parois des cellules endodermiques.

Au niveau du cylindre central, beaucoup de structures (parois des cellules du parenchyme, jonctions cellulaires et liseré dense bordant la cavité des vaisseaux) présentent une forte réaction à ce test. Seules les parois des cellules du péricycle et les parois épaissies des vaisseaux du xylème montrent une réaction négative au test PATAg.

2. Le marquage de Gomori-Swift

Ce marquage permet la mise en évidence des protéines riches en cystine.

En surface (Planche VIII, Fig. 1), le mucilage est plus ou moins fortement marqué. Dans le manteau, les parois fongiques réagissent très faiblement au réactif de Swift (Planche VIII, Fig. 2) alors que le ciment interhyphal est très réactif dans cette zone.

Au niveau du réseau de Hartig (Planche VIII, Fig. 3), les parois fongiques sont faiblement marquées. En revanche, le marquage observé au niveau du cytoplasme des hyphes est intense. Les parois des cellules corticales voisines restent claires. Le ciment reliant les deux partenaires est peu réactif.

Les différentes structures du cortex (Planche VIII, Fig. 4), présentent une réaction négative au réactif de Swift, excepté le cytoplasme des cellules. La lamelle moyenne est réactive.

Dans le cylindre central, seules les parois des cellules du péricycle et des vaisseaux xylémiens ne sont pas marquées. Les autres structures montrent une réaction variable. En effet, les parois des cellules du parenchyme et les jonctions cellulaires réagissent faiblement alors que le liseré pariétal dense qui borde la cavité des vaisseaux réagit fortement à ce marquage.

	CONSTITUANTS	NATURE CHIMIQUE	
		RENDZINE BRUNIFIEE	
		Polysaccharides	Protéines
Manteau externe	Parois fongiques	+	+
	Ciment	+++	+
Manteau interne	Parois fongiques	(+)	++
	Ciment	+	++
	Glycogène	+++	-
Réseau de Hartig	Parois fongiques	+(+)	++
	Parois des cellules corticales voisines	+(+)	++
	Ciment	+(+)	++
	Glycogène	+++	-
Cortex	Parois des cellules corticales	-	+
	Jonctions cellulaires	-	+
	Parois des cellules endodermiques	-	-
Cylindre central	Parois des cellules du péricycle	+(+)	+
	Parois des cellules du parenchyme	+(+)	++
	Jonctions cellulaires	+(+)	++
	Parois lignifiées des vaisseaux	+	++
	Liseré interne des parois du xylème	++	++

Tableau 6 : Organisation et nature glycoprotéique des constituants formant les structures présentes dans les mycorhizes de *Fagus sylvatica / Lactarius subdulcis* prélevées en été dans la rendzine brunifiée.

B. LES MYCORHIZES DE *LACTARIUS SUBDULCIS*

Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau 6 et dans la planche IX.

1. Le test PATAg

Dans le manteau externe (Planche IX, Fig. 1), les parois fongiques et le ciment interhyphal réagissent fortement au test PATAg. La réaction observée au niveau du ciment est toutefois plus intense.

L'analyse des structures du manteau interne (Planche IX, Fig. 2), indique que les parois cellulaires sont faiblement marquées alors que le ciment interhyphal l'est plus. Comme dans le cas des mycorhizes à *Cenococcum geophilum*, le test PATAg révèle la présence de glycogène dans le cytoplasme des hyphes. La paroi des laticifères (Planche IX, Fig. 3) est peu réactive. Par contre, le latex est bordé par un faible marquage.

Dans le réseau de Hartig (Planche IX, Fig. 4), les parois hyphales, celles des cellules corticales voisines et le ciment interfacial réagissent assez fortement au test PATAg. Le glycogène fongique intracytoplasmique est également fortement marqué.

Les différentes structures du cortex (parois des cellules corticales et endodermiques, méats) ne sont pas marquées par le test PATAg (Planche IX, Fig. 5).

Dans le cylindre central (Planche IX, Fig. 6), les parois des cellules du péricycle et du parenchyme réagissent fortement au test PATAg de même que les jonctions cellulaires. En revanche, une faible réponse a été observée au niveau des parois épaissies des vaisseaux du xylème. Le liseré pariétal dense qui borde la cavité des vaisseaux est très réactif.

2. Le marquage de Gomori-Swift

La quasi-totalité des structures fongiques des mycorhizes (Planche IX, Fig. 7 et 8), réagissent positivement au réactif de Swift. Toutefois, si les parois fongiques et le ciment interhyphal du manteau externe sont très faiblement marqués, les parois des hyphes formant le manteau interne (Planche IX, Fig. 7) et le réseau de Hartig (Planche IX, Fig. 8) ainsi que les ciments interfaciaux réagissent plus fortement. De même, les parois des cellules corticales voisines du réseau de Hartig sont bien marquées (Planche IX, Fig. 8).

Dans le cortex (Planche IX, Fig. 9), les parois des cellules réagissent négativement alors que les contours des jonctions cellulaires sont marqués. D'autre part, les parois des cellules endodermiques ne sont pas marquées.

	CONSTITUANTS	NATURE CHIMIQUE	
		RENDZINE BRUNIFIEE	
		Polysaccharides	Protéines
Cortex	Parois des cellules corticales	+	-
	Parois des hyphes intracellulaires	++	-
	Jonctions cellulaires	+	-
	Parois des cellules endodermiques	-	-
Cylindre central	Parois des cellules du suber	-	-
	Parois des cellules du phellogène	-	-
	Parois des cellules du parenchyme	-	-
	Jonctions cellulaires	+	-
	Parois lignifiées des vaisseaux	-	+++
	Liseré dense interne des vaisseaux	+++	+++

Tableau 7 : Organisation et nature glycoprotéique des constituants formant les structures présentes dans les racines porteuses de mycorhizes de *Fagus sylvatica* prélevées en été dans la rendzine brunifiée.

Toutes les structures du cylindre central réagissent fortement au réactif de Swift, excepté les parois des cellules du péricycle qui semblent réagir plus faiblement.

C. LES RACINES PORTEUSES DE MYCORHIZES DE *FAGUS SYLVATICA*

Le tableau 7 rassemble les différents résultats obtenus. Ceux-ci sont également illustrés dans la planche X

1. Le test PATAg

Les parois des cellules corticales réagissent peu à ce test (Planche X, Fig. 1). En revanche, les parois des hyphes intracellulaires présentent une réaction au test PATAg (Planche X, Fig. 1).

Au niveau de l'endoderme (Planche X, Fig. 2), les parois cellulaires ne réagissent pas à ce test.

Les parois des cellules du suber et du phellogène sous-jacents (Planche X, Fig. 2), présentent également une réaction négative au test PATAg.

Dans le cylindre central (Planche X, Fig. 3), la paroi épaissie des vaisseaux xylémiens et les parois cellulaires du parenchyme médullaire montrent une réaction négative alors que les autres structures présentent une réaction variable. Les jonctions cellulaires sont faiblement marquées, par contre le liseré pariétal bordant la cavité des vaisseaux est très réactif au test PATAg. Une zone pariétale fortement marquée subsiste au niveau des communications entre les vaisseaux (Planche X, Fig. 3).

2. Le marquage de Gomori-Swift

Dans le cortex, les parois des cellules corticales et des hyphes intracellulaires ainsi que les jonctions cellulaires ne réagissent pas au réactif de Swift. Il en est de même des cellules endodermiques (Planche X, Fig. 4).

L'absence de marquage a également été observée au niveau des parois des cellules du suber et du phellogène.

Au niveau du cylindre central (Planche X, Fig. 5), les parois des cellules du parenchyme et les jonctions cellulaires présentent aussi une réaction négative. En revanche, la paroi épaissie des vaisseaux xylémiens ainsi que le liseré pariétal qui borde leur cavité réagissent fortement au réactif de Swift.

	CONSTITUANTS	*RENDZINE BRUNIFIEE*		
		Calcium	Azote	Silicium
Surface de la mycorhize	Mucilage	++	+	traces
Manteau externe	Parois fongiques	-	traces	traces
	Ciment	++	+	traces
Manteau interne	Parois fongiques	-	-	-
	Ciment	-	-	-
	Plages de polyphénols striées	++++	+++	traces
	Plages de polyphénols non striées	+++	+(+)	traces
	Globules vacuolaires	no	no	no
	Granules de polyphosphates	++ **	-	-
Réseau de Hartig	Parois fongiques	-	-	-
	Parois des cellules corticales	(+)	(+)	-
	Ciment	+(+)	+(+)	-
	Polyphénols vacuolaires	+	+	-
	Globules vacuolaires	++	++	-
	Granules de polyphosphates	no	no	no
Cortex	Parois des cellules corticales	-	+	-
	Jonctions cellulaires	+(+)	+	-
	Parois des cellules endodermiques	+	+(+)	-
	Polyphénols de l'endoderme	+	+	-
Cylindre central	Parois des cellules du péricycle	-	traces	-
	Parois des cellules du parenchyme	-	traces	-
	Polyphénols du parenchyme	+++	+(+)	-
	Jonctions cellulaires	(+)	+(+)	-
	Parois lignifiées des vaisseaux	-	(+)	-
	Liseré interne des parois du xylème	-	traces	-

Tableau 8 : Localisations du calcium, de l'azote et du silicium dans les structures des mycorhizes de *Fagus sylvatica* / *Cenococcum geophilum* prélevées en été dans la rendzine brunifiée. ** : associé au phosphore.

V. ETUDE MICROANALYTIQUE

Cette étude, a été réalisée en microscopie électronique à transmission, par deux techniques spectroscopiques EELS et EDXS. Elles permettent de localiser à l'échelle sub-cellulaire les éléments minéraux recherchés (calcium, azote, silicium, ...).

A. LES MYCORHIZES DE *CENOCOCCUM GEOPHILUM*

Les différents résultats sont rassemblés dans le tableau 8. La planche XI présente quelques spectres caractéristiques de certaines structures.

1. La surface des mycorhizes

La microanalyse indique que le calcium et l'azote sont accumulés dans le mucilage présent en surface de la mycorhize. Du silicium y est également détecté à l'état de traces. Les cristaux, observés à la surface des mycorhizes en microscopie électronique à transmission, correspondent à du silicium cristallisé (quartz). Les dépôts amorphes également riches en silicium se sont avérés être de la silice (Planche XI, Fig. 1 ; Spectre 1a).

2. Le manteau

Alors que le calcium n'est pas détecté dans le manteau superficiel au niveau des parois des hyphes, il est accumulé dans le ciment interhyphal. L'azote est peu accumulé dans ce ciment mais il a été détecté à l'état de traces dans les parois fongiques. Le silicium n'est présent qu'à l'état de traces dans ces structures.

Dans le manteau plus interne, l'azote et surtout le calcium, sont très abondamment stockés dans les plages de polyphénols striées ou non, localisées à proximité des cellules corticales (Planche XI, Fig. 2 ; Spectre 2a). Ces éléments n'ont pas été détectés dans les parois fongiques ni dans le ciment. L'analyse des granules vacuolaires révèle que ceux-ci contiennent du calcium associé à du phosphore (Planche XI, Fig. 2 ; Spectre 2b). Il s'agit de granules de polyphosphates. Au niveau de la partie interne du manteau, seules les plages de composés polyphénoliques striées ou non renferment du silicium.

3. Le réseau de Hartig

Le calcium, l'azote n'ont pas été détectés dans les parois fongiques. Toutefois, ces deux éléments sont présents en assez grande proportion dans le ciment et dans les globules

vacuolaires fongiques. Au niveau racinaire, l'azote et le calcium sont faiblement détectés dans les parois des cellules corticales voisines du réseau de Hartig. La présence d'azote a également été révélée dans le cytoplasme de ces cellules alors que le calcium y est absent. Les polyphénols vacuolaires sont pauvres en ces deux éléments.

La présence de silicium n'a pas été révélée dans les structures fongiques et racinaires.

4. Le cortex profond

Les jonctions cellulaires renferment de l'azote en faible proportion et accumulent davantage de calcium. Les parois végétales ne stockent ni calcium ni silicium mais accumulent légèrement l'azote.

La paroi épaisse des cellules endodermiques renferme de l'azote en assez grande proportion, alors que le calcium y est plus faiblement détecté. Ces deux éléments sont également présents dans les polyphénols vacuolaires contenus dans ces cellules. Le silicium semble être absent de l'ensemble des structures du cortex.

5. Le cylindre central

Dans le cylindre central, le calcium est fortement accumulé dans les composés polyphénoliques présents dans les vacuoles des cellules parenchymateuses. Par contre, il n'a été détecté ni dans les parois des cellules du péricycle et du parenchyme ni dans celles des vaisseaux. Les jonctions cellulaires situées entre les cellules parenchymateuses voisines des vaisseaux conducteurs en renferment peu.

L'azote est accumulé en moins grande proportion dans les différentes structures du cylindre central mais sa répartition est plus homogène. En effet, il est relativement abondant dans les polyphénols vacuolaires du parenchyme et dans les jonctions cellulaires mais il est présent seulement à l'état de traces dans les parois des cellules du péricycle et du parenchyme et dans le liseré dense bordant la cavité des vaisseaux. La paroi des vaisseaux renferme de faibles proportions d'azote. Le silicium n'a pas été détecté dans le cylindre central.

B. Les mycorhizes de *Lactarius subdulcis*

L'ensemble des résultats est présenté dans le tableau 9 et dans la planche XI.

	CONSTITUANTS	*RENDZINE BRUNIFIEE*		
		Calcium	Azote	Silicium
Surface de la mycorhize		(+)	(+)	-
Manteau externe	Parois fongiques	traces	traces	traces
	Ciment	+	+	traces
Manteau interne	Parois fongiques	traces	traces	traces
	Ciment	+	+(+)	traces
	Plages de polyphénols striées	++	++	traces *
	Plages de polyphénols non striées	no	no	no
	Globules vacuolaires	+(+)	++	traces
	Granules de polyphosphates	++**	-	-
Réseau de Hartig	Parois fongiques	-	(+)	traces *
	Parois des cellules corticales	-	-	traces
	Ciment	-	+	traces
	Polyphénols vacuolaires	+	+	traces
	Granules de polyphosphates	+(+)**	-	-
	Globules vacuolaires	+	+(+)	traces
Cortex	Parois des cellules corticales	-	-	traces
	Jonctions cellulaires	-	-	-
	Parois des cellules endodermiques	+	+	traces
	Polyphénols de l'endoderme	+	+	traces *
Cylindre central	Parois des cellules du péricycle	traces	traces	traces
	Parois des cellules du parenchyme	traces	traces	traces
	Polyphénols du parenchyme	+(+)	+(+)	-
	Jonctions cellulaires	+(+)	+(+)	traces
	Parois lignifiées des vaisseaux	-	-	traces
	Liseré dense interne des vaisseaux	-	-	-

Tableau 9 : Localisations du calcium, de l'azote et du silicium dans les structures des mycorhizes de *Fagus sylvatica* / *Lactarius subdulcis* prélevées en été dans la rendzine brunifiée. * : associé à des traces d'aluminium ; ** : associé au phosphore.

1. La surface des mycorhizes

En été, la surface des mycorhizes présente une faible capacité à fixer le calcium et l'azote. Le silicium semble être absent.

2. Le manteau

Le calcium, l'azote et le silicium sont faiblement détectés dans les parois fongiques des manteaux externe et interne. En revanche, les ciments accumulent davantage le calcium et l'azote. Ces deux éléments sont abondamment détectés dans les plages polyphénoliques striées du manteau interne. Elles contiennent également des traces de silicium et d'aluminium. Les vacuoles fongiques du manteau interne, renferment deux types de granules : des globules aux contours flous, riches en azote (Planche XI, Fig. 3 ; Spectre 3a) et contenant des proportions variables de calcium et des traces de silicium ; des granules plus petits, riches en phosphore et en calcium, mais sans azote ni silicium (Planche XI, Fig. 2 ; Spectre 2b).

3. Le réseau de Hartig

Les parois fongiques et le ciment semblent être dépourvus de calcium, alors qu'ils contiennent de l'azote et des traces de silicium. Les hyphes renferment les deux types de corpuscules vacuolaires décrits dans le manteau interne : les globules riches en azote associé à de faibles teneurs en calcium et en silicium ; et les granules riches en phosphore et en calcium.

Les parois des cellules corticales voisines du réseau de Hartig renferment uniquement des traces de silicium. En revanche, les polyphénols vacuolaires de ces cellules contiennent à la fois du calcium, de l'azote et du silicium mais en faible proportion.

4. Le cortex profond

Le calcium et l'azote n'ont été détectés ni dans les parois des cellules du cortex exempt de champignon ni dans les jonctions cellulaires. Cependant, leur présence a été faiblement révélée dans les cellules endodermiques (parois et composés polyphénoliques vacuolaires).

Les polyphénols de l'endoderme renferment également du silicium à l'état de traces, et de l'aluminium. Le silicium est aussi présent, dans les parois des cellules corticales et endodermiques.

	CONSTITUANTS	*RENDZINE BRUNIFIEE*		
		Calcium	Azote	Silicium
Cortex	Parois des cellules corticales	-	+	-
	Parois des hyphes intracellulaires	-	(+)	-
	Jonctions cellulaires	-	+(+)	-
	Parois des cellules endodermiques	-	(+)	traces
	Liseré interne pariétal / endoderme	-	-	silice
	Polyphénols de l'endoderme	-	+	traces
Cylindre central	Parois des cellules du suber	-	-	-
	Liseré interne pariétal / suber	-	-	silice
	Parois des cellules du phellogène	-	-	+
	Parois des cellules du parenchyme	-	-	-
	Polyphénols du parenchyme	-	-	-
	Jonctions cellulaires	-	-	-
	Parois lignifiées des vaisseaux	-	-	-
	Liseré dense interne des vaisseaux	-	-	-

Tableau 10 : Localisations du calcium, de l'azote et du silicium dans les structures des racines porteuses de mycorhizes de *Fagus sylvatica* prélevées en été dans la rendzine brunifiée.

5. Le cylindre central

Le calcium, l'azote et le silicium ont été détectés à l'état de traces dans les parois des cellules péricycliques et parenchymateuses. Lorsque des polyphénols sont produits par ces cellules, ils renferment des proportions non négligeables de calcium et d'azote. Il en est de même pour les jonctions entre les cellules parenchymateuses proches du xylème. Par contre, la paroi des vaisseaux du xylème ne semble pas en accumuler.

Des traces de silicium sont détectées dans les parois des cellules du péricycle, dans les jonctions cellulaires et dans les parois secondaires lignifiées des vaisseaux.

C. Les racines porteuses de mycorhizes de *Fagus sylvatica*

Les résultats des différentes analyses sont présentés dans le tableau 10 et dans la planche XI.

1. Le cortex

Le cortex accumule peu d'azote et pas de calcium. En effet, le calcium n'est pas détecté dans les parois des cellules corticales et endodermiques. Seul de l'azote a été faiblement détecté dans les parois de ces cellules. Cet élément est cependant plus abondamment présent dans les jonctions intercellulaires.

Dans les hyphes envahissant le cortex, la présence de calcium n'a pas été révélée dans les parois fongiques. En revanche, de l'azote y est détecté en faible proportion.

Au niveau des cellules de l'endoderme et du suber sous-jacent, une bande de silice a été observée contre la paroi interne de ces cellules (Planche XI, Fig. 4 ; Spectre 4a). Cette bande de silice est également clairement observée lorsqu'une cartographie X est réalisée (Planche XI, Fig. 5). Le silicium est également présent à l'état de traces dans la paroi épaissie des cellules endodermiques et dans la paroi des cellules du phellogène. Les polyphénols vacuolaires contenus dans les cellules endodermiques en renferment également des traces.

2. Le cylindre central

Dans le cylindre central (parois et polyphénols des cellules du parenchyme, parois des vaisseaux, jonctions cellulaires, cytoplasme des cellules parenchymateuses quand il est visible), la présence de calcium, d'azote et de silicium n'a pas été révélée.

DISCUSSION :

La première partie de ce travail a consisté à caractériser deux mycorhizes naturelles (*Fagus sylvatica / Cenococcum geophilum* et *Fagus sylvatica / Lactarius subdulcis*) et leurs racines porteuses sur un sol spécifique et à une période donnée de l'année. Les résultats obtenus doivent servir de référence pour des études ultérieures afin de mettre en évidence l'effet du sol et des saisons sur les associations mycorhiziennes.

Des études antérieures concernant *Cenococcum geophilum* (Trappe, 1962 ; Mikola, 1948) et les mycorhizes de *Lactarius subdulcis* en association avec le Hêtre (Prévost et Pargney, 1995 ; Pargney et Prévost, 1996 ; Prévost et Pargney, 1997) ont permis d'identifier les deux types de mycorhizes choisis.

Leur caractérisation a été complétée au niveau morphologique, histologique, ultrastructural et cytochimique. De plus, la cytolocalisation en microscopie électronique à transmission de certains éléments du sol dans les structures mycorhiziennes a mis en évidence les sites d'accumulation pour ces éléments absorbés.

I. LES ASSOCIATIONS SYMBIOTIQUES FORMEES PAR *CENOCOCCUM GEOPHILUM* ET *LACTARIUS SUBDULCIS*

A. COMPARAISON MORPHOLOGIQUE

Les deux mycorhizes récoltées dans la rendzine brunifiée se différencient par de nombreux critères notamment par leur couleur, leur taille et leur abondance.

Ainsi, la mycorhize de *Cenococcum geophilum* est de couleur noir charbon caractéristique du mycélium végétatif de *Cenococcum* (Trappe, 1962). Cependant, Ferdinandsen et Winge (1925) considèrent que cette coloration serait due à l'âge puisque l'extrémité des hyphes en croissance est hyaline à jaune clair alors que les cellules plus âgées sont plus noires (Trappe, 1962). Une telle variation de couleur en fonction de l'âge de l'organe existe chez d'autres associations mycorhiziennes comme chez les mycorhizes formées par *Tuber* et *Corylus* qui de claires deviennent brun foncé en vieillissant (Pargney, 1994) ou encore chez les mycorhizes de *Lactarius subdulcis* récoltées dans un sol brun lessivé (Prévost et Pargney, 1995) qui de jaune clair virent au jaune orangé lorsqu'elles sont matures. Cette couleur plus ou moins prononcée des mycorhizes de lactaire a également été observée au niveau de nos échantillons issus du sol calcaire. Cela n'a pas facilité leur récolte puisque ces mycorhizes coexistent notamment avec un autre lactaire, *Lactarius blennius* de couleur

jaune clair (Prévost, 1992). L'observation de coupes en microscopie photonique s'est donc révélée indispensable dans ce cas pour une identification fiable des échantillons.

Les mycorhizes de *Cenococcum geophilum* sont généralement de petite taille avec un mycélium extramatriciel bien développé, ce qui leur permet d'explorer un volume plus important de substrat où elles puisent l'eau et les éléments nutritifs dont elles ont besoin. En revanche, les mycorhizes de *Lactarius subdulcis* ont une taille cinq fois plus importante (environ 5 mm), mais elles ne présentent pas de mycélium extramatriciel. La surface de l'organe est lisse et aucune formation telle que des rhizomorphes (agrégations d'hyphes), n'a été observée. Il semble toutefois, que *Lactarius subdulcis* soit capable de former de telles structures puisque Prévost et Pargney (1997) ont remarqué parfois la présence de rhizomorphes se dégageant de la base des mycorhizes récoltées dans un sol brun lessivé naturel. Des études antérieures (Voiry, 1981 ; Blaise et Garbaye, 1983 ; Lei, 1988 ; Prévost, 1992) ont ainsi suggéré que les mycorhizes à mycélium frangeant étaient plus efficaces dans la nutrition des plantes que les mycorhizes lisses. Les mycorhizes développant des hyphes extramatricielles seraient ainsi plus fréquentes sur les jeunes plants qui ne donnent pas une grande quantité de matière organique, alors que les mycorhizes lisses coloniseraient plutôt les racines des arbres adultes qui fournissent de la matière organique en abondance. Ces mycorhizes lisses stimuleraient également la rhizogenèse de manière à augmenter le nombre d'apex racinaires susceptibles d'explorer le sol.

L'observation des différentes associations mycorhiziennes établies sur le système racinaire du Hêtre a révélé que, dans ce sol, les mycorhizes de *Cenococcum geophilum* constituent le type mycorhizien le plus abondant alors que les mycorhizes à *Lactarius subdulcis* étaient rares.

Il semblerait donc que, dans le sol calcaire et basique, le nombre de mycorhizes soit privilégié par rapport à la taille dans le cas de *Cenococcum geophilum* et inversement pour *Lactarius subdulcis*. Cette différence de proportion entre les deux types mycorhiziens pourrait s'expliquer par une différence de compétitivité entre les deux organismes fongiques. Cependant, *Cenococcum* étant considéré comme un champignon peu compétitif, un autre facteur doit influencer le développement de ces organes symbiotiques.

B. COMPARAISON STRUCTURALE

Les différences morphologiques observées au niveau des deux couples symbiotiques étudiés pouvaient laisser présager des modifications structurales (figure 23).

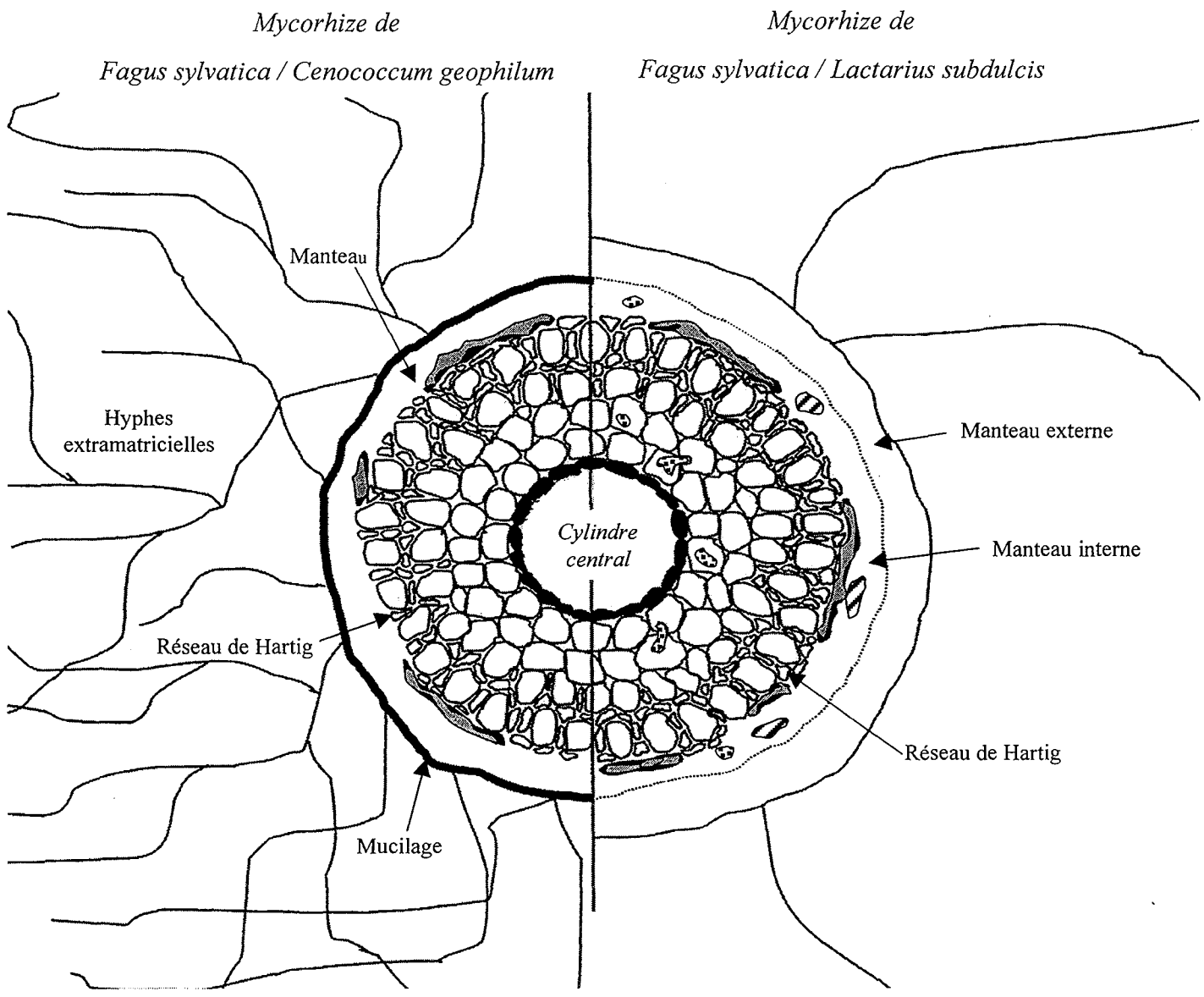


Figure 23 : Représentation schématique de l'organisation des deux mycorhizes récoltées dans la rendzine brunifiée, pendant l'été.

: Ascomycète associé ; : laticifère ; : composés polyphénoliques.

En effet, bien que les mycorhizes se caractérisent toutes les deux par la présence d'un manteau fongique enrobant la racine courte, quelques différences sont à remarquer à ce niveau. D'une part, les interfaces sol-surface du manteau fongique sont différentes. Chez *Lactarius subdulcis*, le manteau est directement en contact avec le sol et les hyphes les plus externes sont mortes alors que l'ectomycorhize de *Cenococcum geophilum* est isolée du sol par un matériel mucilagineux sombre. De plus, le manteau des mycorhizes à *Lactarius subdulcis* est très épais (plus de dix assises cellulaires) alors que celui des mycorhizes de *Cenococcum geophilum* ne comprend que cinq assises d'hyphes environ.

D'autre part, si le manteau des mycorhizes de lactaire se subdivise en une zone externe constituée d'hyphes mortes souvent écrasées (manteau externe) et une zone interne formée d'hyphes vivantes (manteau interne), le manteau des mycorhizes de *Cenococcum* est entièrement vivant à cette époque de l'année. Ceci pourrait s'expliquer par la présence en surface de la mycorhize de ce matériel mucilagineux sombre qui est absent chez les mycorhizes de lactaire. Cette gaine, responsable de la coloration noire des mycorhizes de *Cenococcum geophilum*, correspondrait à des exsudations d'origine pariétale et servirait de protection, notamment contre la sécheresse, permettant ainsi aux couches d'hyphes les plus superficielles de demeurer vivantes (Trappe, 1962). Metzler et Oberwinkler (1987) l'ont définie comme étant de la mélanine. Le manteau des mycorhizes de lactaire se différencie également par la présence dans le manteau interne de structures caractéristiques, les laticifères, impliquées dans la production et le transport de latex (Prévost et Pargney, 1995).

Cette différence de stratification du manteau doit être à l'origine de différences de composition chimique des interfaces qui sont constituées par les parois fongiques et le ciment interhyphal (Dexheimer et Pargney, 1991a et b). Ainsi, chez les mycorhizes de *Cenococcum geophilum*, dont le manteau est entièrement vivant, les parois des hyphes de l'ensemble du manteau montrent une faible réaction au test PATAg et au réactif de Gomori-Swift. Elles sont donc de nature glycoprotéique. Le ciment interhyphal réagit fortement aux deux techniques cytochimiques dans la totalité du manteau. En revanche, chez les mycorhizes de *Lactarius subdulcis*, l'apparition d'un manteau externe mort induit une variation de l'intensité du marquage par les tests cytochimiques. En effet, dans le ciment du manteau externe, le marquage par le test PATAg est plus intense que dans celui du manteau interne confirmant ainsi les résultats obtenus par d'autres travaux (Pargney, 1990, 1991 ; Bawadikji, 1993 ; Pargney et Prévost, 1996). Au niveau des parois des hyphes, la réaction est plus intense dans le manteau externe que dans le manteau interne. En revanche, le marquage par le réactif de Gomori-Swift montre le gradient inverse avec une réactivité plus forte des structures du manteau interne par rapport à celles du manteau externe. La formation d'un manteau externe

dont les hyphes sont mortes ou dégénérescentes entraîne donc des modifications des parois fongiques et du ciment interhyphal aboutissant à l'élaboration d'une structure plus résistante (Pargney, 1991).

Dans les deux mycorhizes, la limite entre le manteau fongique et la racine est marquée par la présence de plages de composés polyphénoliques qui généralement montrent en coupe un aspect plus ou moins strié. Ceci ne reflète sans doute qu'une différence de dureté de ces substances, due à une variation d'imprégnation osmique révélée lors de la réalisation des coupes. Ces composés polyphénoliques d'origine racinaire sont excrétés par les cellules corticales au contact du champignon. Ils sont alors incorporés dans le ciment du manteau interne au fur et à mesure de la progression de celui-ci. Ces substances peuvent d'ailleurs être assimilées par les champignons qui possèdent les enzymes nécessaires à leur dégradation (Pais et Barroso, 1983 ; Pargney et Brimont, 1995).

Le manteau fongique est donc une interface entre le sol et la racine vis-à-vis de laquelle il assure un rôle protecteur (Harley et Smith, 1983). Cette protection serait principalement assurée par le mucilage dans le cas des mycorhizes de *Cenococcum geophilum*, alors que chez les mycorhizes de *Lactarius subdulcis,* l'épaisseur du manteau fongique jouerait ce rôle.

II. LES RELATIONS ENTRE LES SYMBIONTES FONGIQUES ET LA RACINE DE HETRE

A partir du manteau fongique, le champignon progresse vers l'intérieur de la racine, entre les cellules racinaires pour former le réseau de Hartig, zone d'échanges divers entre les deux partenaires. Celui-ci est, dans le cas des deux mycorhizes étudiées, unisérié et continu. L'interface à ce niveau change par rapport à celle du manteau puisque le ciment n'est plus exclusivement d'origine fongique, mais est produit à la fois par les parois fongiques et végétales. En effet, au ciment issu de la paroi fongique s'ajoutent des composés pectiques d'origine spécifiquement racinaire issus de la lamelle moyenne des cellules corticales, démantelée au moment de la mise en place du réseau de Hartig (Massicotte *et al.*, 1990 ; Boutekrabt et Pargney, 1991 ; Gea, 1995). La différence de marquage par les tests cytochimiques qui a été observée au niveau des interfaces du réseau de Hartig, pourrait s'expliquer par la nature différente des structures fongiques qui dans un cas sont formées par un Ascomycète et dans l'autre cas par un Basidiomycète. Ainsi, dans les ectomycorhizes de *Cenococcum geophilum*, le marquage des interfaces du réseau de Hartig par le test PATAg est intense mais il est faible dans le cas du réactif de Gomori-Swift. Les parois hyphales sont donc davantage polysaccharidiques que protéiques. En revanche, dans les ectomycorhizes de

Lactarius subdulcis, les interfaces entre les cellules corticales et les hyphes réagissent fortement aux deux techniques cytochimiques.

Le réseau de Hartig établit par les deux champignons s'étend sur environ deux assises cellulaires et il est bordé latéralement par les cellules corticales de la racine. La présence de mitochondries dans les cytoplasmes des hyphes comme dans celui des cellules corticales révèle un fonctionnement physiologique actif à cette époque de l'année. Les cellules corticales voisines du réseau produisent toutefois des composés polyphénoliques vacuolaires. La fonction de régulation des phénols racinaires dans les interactions plantes-champignons a déjà été évoqué par différents auteurs (Harborne, 1980, 1982 ; Sylvia et Sinclair, 1983 ; Chakravarty et Unestam, 1986). De même, Malajczuk *et al.* (1984) pensent que les tanins racinaires jouent un rôle dans le contrôle du champignon mycorhizien, en régulant la formation du réseau de Hartig. Dans notre étude, la production de ces substances serait également une réponse à la présence du symbionte. Dans la symbiose mycorhizienne, les racines mettent en place des mécanismes de défense habituellement utilisés pour empêcher une infection par un champignon pathogène. Toutefois, les champignons ectomycorhiziens provoquent des réactions de défense compatibles avec l'établissement de la symbiose chez les racines du fait de l'échange de signaux de reconnaissance entre les deux partenaires (Piché *et al.*, 1988 ; Martin et Hilbert, 1991), tels que des lectines et des flavonoïdes émis par la racine ou des auxines fongiques (Béguiristain, 1996). Dans notre étude, les deux champignons étudiés induisent une production similaire de composés polyphénoliques par la racine indiquant sans doute des degrés d'agressivité voisins. Néanmoins, l'activité fongicide des composés polyphénoliques doit être nuancée. En effet, Piché *et al.* (1981) n'ont pas trouvé de différences significatives dans le contenu en composés polyphénoliques des mycorhizes et des racines non infectées de Pin.

Le développement du champignon dans la racine reste confiné au cortex superficiel. Le cortex profond des mycorhizes de *Cenococcum* et de *Lactarius* est généralement dépourvu de mycélium. Dans les deux mycorhizes, le champignon n'atteint jamais l'endoderme dont les cellules sont généralement remplies de composés polyphénoliques. L'endoderme préserve ainsi le cylindre central des mycorhizes d'une invasion massive par les champignons. Il semble donc que si les polyphénols racinaires produits dans la zone du réseau de Hartig limitent le développement du champignon mycorhizien, ceux présents dans l'endoderme constituent une véritable barrière physique au passage du partenaire fongique.

Dans le cas des mycorhizes de *Lactarius subdulcis*, des hyphes intracellulaires ont pu être cependant observées dans le cortex profond. Ces hyphes sont souvent de taille supérieure à celle des hyphes constituant le manteau ou le réseau de Hartig. La couche externe de leur

paroi est généralement sombre à la différence de celle de la paroi des hyphes de *Lactarius*. Il s'agirait donc d'un deuxième champignon. Ces hyphes sont également présentes dans le manteau formé par *Lactarius subdulcis*. Brand (1987, 1993) a observé la présence d'un champignon ascomycète en association avec *Lactarius subdulcis* dans les mycorhizes qu'il forme avec *Fagus sylvatica*. Cet Ascomycète a été défini comme étant *Leucoscypha leucotricha*, de la famille des Humariacées, qui colonise les litières forestières en décomposition (Denis, 1968). D'après Brand (1987), la présence de ce champignon supplémentaire ne perturberait pas les relations ectomycorhiziennes ni la croissance racinaire. Ces triples associations ne sont pas rares sur les racines de Hêtre (Brand, 1987). Elles existent également chez les Conifères où l'on peut observer la présence simultanée de *Chroogomphus* ou *Gomphidius* avec *Suillus* ou *Rhizopogon* (Agerer, 1990). Cependant, il s'agit de quatre genres appartenant à la classe des Basidiomycètes. Ce sont donc, dans ce cas, des champignons plus proches les uns des autres que les lactaires et les Ascomycètes. L'Ascomycète associé à la mycorhize de lactaire, outre les cellules corticales, peut coloniser les cellules tanifères de la coiffe et même les cellules de la zone méristématique. Prévost et Pargney (1995) ne considèrent pas ce champignon comme un champignon symbiotique mais plutôt comme un saprophyte puisqu'ils l'ont essentiellement observé dans des cellules mortes ou dégénérescentes. Dans notre cas, en dépit de la présence de cet Ascomycète, les deux partenaires des mycorhizes de *Lactarius subdulcis* (le lactaire et la racine) récoltées à cette époque de l'année, étaient vivants et aucun signe de dégénérescence n'a été décelé. Toutefois, cet Ascomycète n'a pas été observé au niveau du réseau de Hartig, siège des échanges trophiques entre les deux partenaires de la symbiose, et était souvent intracellulaire, ce qui tend à confirmer l'interprétation des auteurs cités précédemment.

III. LES RACINES PORTEUSES DE MYCORHIZES

Les racines porteuses prélevées soit à proximité des mycorhizes de *Cenococcum* soit à proximité des mycorhizes de *Lactarius*, présentent une organisation similaire. Elles peuvent être recouvertes en partie par du mycélium sans toutefois aboutir à la formation d'un manteau organisé comme dans le cas d'une mycorhize véritable. Cependant, des hyphes intracellulaires sont présentes en grand nombre dans les cellules du cortex. Ce dernier est d'ailleurs dégénérescent et tend à se détacher progressivement du reste de la racine au niveau de l'endoderme. Dans certains échantillons, la paroi de certaines hyphes intracellulaires apparaît dense laissant supposer qu'il s'agit d'un Ascomycète alors que dans d'autres objets, la paroi des hyphes intracellulaires est claire indiquant la présence d'un Basidiomycète.

Bien que dégénérescent, le cortex racinaire participe à la préservation de l'intégrité du reste de la racine. En effet, des épaississements pariétaux importants de la paroi des cellules du cortex ont été observés. Cette paroi plus épaisse doit limiter la progression radiale du champignon. Toutefois, cet épaississement pariétal ne concerne pas la totalité de la paroi mais seulement celle dirigée vers l'intérieur de la racine. A un fort grandissement, en microscopie électronique à transmission, elle apparaît parfois formée de la juxtaposition de lamelles rappelant la subérification des parois de certaines cellules. Il se pourrait donc que ces cellules correspondent à des restes de l'assise subéreuse et ne soient pas seulement une réponse pour limiter l'invasion mycélienne.

Le cylindre central de ces racines porteuses comprend des formations secondaires. Le phellogène, mis en place dans le péricycle, produit vers l'extérieur du suber. Les cellules de l'endoderme et du suber différencié sous-jacent, sont remplies de composés polyphénoliques qui pourraient agir comme une barrière physique empêchant ainsi l'envahissement du cylindre central par les hyphes.

La présence de la couche de silice qui a été observée contre la paroi interne des cellules de l'endoderme et du suber différencié sous-jacent de la racine, est absente au niveau de l'endoderme des mycorhizes. Dans la racine porteuse, la formation de cette couche de silice est corrélée avec l'absence de cortex. En effet, elle n'a pas été observée dans les racines porteuses chez lesquelles le cortex est vivant et toujours en relation avec l'endoderme. En revanche, lorsque le cortex est détaché de la racine, la couche de silice est observée. Il semblerait donc que le cortex vivant assure en grande partie la protection de la racine contre un envahissement trop important du champignon. En revanche, après desquamation du cortex, l'endoderme et le suber sont les barrières qui préservent l'intégrité du cylindre central. Les couches de silice pourraient donc renforcer la défense de la stèle vis-à-vis des organismes étrangers.

Il semble donc que la racine porteuse adopte une stratégie différente de celle des mycorhizes pour préserver l'intégrité racinaire. En effet, l'absence d'un manteau organisé comparable à celui des mycorhizes induit la mise en place d'autres systèmes de défense. Ainsi, l'endoderme et le suber sont formés de cellules remplies de polyphénols qui constituent une barrière active, renforcée par les bandes de silice, contre les organismes étrangers. Ces structures servent également de barrière vis-à-vis des éléments minéraux du sol qui ont été absorbés, comme semblent le montrer les analyses qui ont révélé des tissus racinaires extrêmement pauvres en ions. Cette fonction de barrière de l'assise endodermique a également été reliée à la composition chimique des parois cellulaires (Kolattukydy, 1984 ; Monties, 1989 ; Lange *et al.*, 1995 ; Zeier et Schreiber, 1998).

Cette organisation de la racine porteuse ainsi que celle des deux mycorhizes peuvent être mises en relation avec la fonction de l'organe. En effet, la racine porteuse assure la fonction de conduction axiale des nutriments vers le reste de l'arbre. Son anatomie est donc en relation directe avec cette fonction. L'endoderme joue ainsi le rôle de barrière physique contre le passage des organismes et constitue un filtre actif qui limite fortement voire inhibe le transport radial des nutriments par leur immobilisation dans les composés polyphénoliques. De même, les cellules du suber les plus externes sont remplies de polyphénols qui filtrent également les éléments minéraux ayant malgré tout transité. Tout ceci concourt au fait que le transport axial est alors favorisé. A l'inverse, les mycorhizes sont spécialisées dans l'absorption des ions et des petites molécules du sol et dans leur transport radial vers la racine. Le champignon assure ainsi un rôle dans la régulation de cette absorption et du transport radial des éléments minéraux (Le Disquet, 1997).

IV. COMPORTEMENT DES MYCORHIZES VIS-A-VIS DES ELEMENTS DU SOL

L'étude analytique a permis de mettre en évidence les différents sites d'accumulation de certains éléments (calcium, azote, silicium) puisés dans le sol par les hyphes et stockés dans les structures mycorhiziennes.

Comme cela a été dit précédemment, des modifications ultrastructurales notamment du manteau mycorhizien vont de paire avec des modifications de la composition chimique des interfaces. Il est donc probable également que les structures fongiques et racinaires des mycorhizes présentent des capacités variables d'accumulation des éléments minéraux. Il convient de préciser ici que lorsque l'accumulation d'un élément est mentionnée, par l'une ou l'autre des techniques, elle correspond à un spectre d'analyse au niveau duquel le pic caractéristique de l'élément recherché est clairement visible. C'est particulièrement le cas du silicium dont la détection en microanalyse X est parfois perturbée par la présence de l'osmium dans les structures analysées.

Ainsi, le mucilage présent en surface des ectomycorhizes de *Cenococcum geophilum* accumule du calcium, de l'azote organique et inorganique et du silicium. Cela est sans doute dû à la nature même des composés polysaccharidiques et protéiques qui, par leurs charges négatives, sont aptes à fixer ces éléments chargés positivement. Cependant, une faible proportion de silicium est détectée dans le mucilage. Cet élément qui provient du quartz et de formations siliceuses présents en surface de l'organe, est peu absorbé ce qui explique la pauvreté des tissus racinaires de ces mycorhizes en cet élément minéral. Les ectomycorhizes de *Lactarius subdulcis*, ne possédant pas un tel mucilage, montrent une capacité plus faible à

fixer sur leur surface les éléments recherchés. Notamment, le silicium n'a pas été détecté à ce niveau alors que la majorité des structures fongiques et racinaires des mycorhizes de lactaire accumulent cet ion.

Dans le manteau des deux mycorhizes étudiées, certaines structures sont des sites privilégiés de l'accumulation des éléments minéraux recherchés : les ciments interhyphaux ainsi que les plages de composés polyphénoliques. L'importance des composés polyphénoliques dans la rétention des cations (Genet, 1994 ; Genet et Pargney, 1994 ; Pargney et Kottke, 1994 ; Pargney et Brimont, 1995 ; Le Disquet, 1997) ou des métaux lourds (Le Disquet, 1997) est maintenant bien connue. Dans notre étude, une variation de l'accumulation des ions dans ces substances a été observée entre les deux mycorhizes. C'est ainsi que de très fortes proportions de calcium et d'azote ont été détectées dans les polyphénols striés et non striés du manteau des ectomycorhizes de *Cenococcum geophilum* alors que ceux (striés) du manteau des mycorhizes de *Lactarius subdulcis* en renferment moins. Plusieurs hypothèses peuvent être émises pour expliquer ces faits. D'une part, il existe différents types de composés polyphénoliques se distinguant par leur composition chimique, leur degré de maturation, leur origine. Une étude cytochimique a ainsi montré que les composés phénoliques des mycorhizes d'*Eucalyptus* étaient chimiquement différents de ceux de la coiffe racinaire ou de l'épiderme (Ling-Lee *et al.*, 1977). Toutefois, dans les deux mycorhizes étudiées, les polyphénols incorporés au manteau ont une origine corticale. D'autre part, pour parvenir à la racine, les ions du sol doivent être absorbés avant d'être transportés via le symplasme et/ou l'apoplasme fongiques jusqu'à la racine. Ceci implique une régulation par le champignon. Une différence de capacité d'absorption des ions pourrait donc être à l'origine de leur accumulation différentielle dans les composés polyphénoliques ainsi que dans les structures fongiques. Nous avons précisé précédemment qu'une partie des éléments étaient immobilisés dans le mucilage pour les mycorhizes de *Cenococcum*, ce qui n'est pas le cas des mycorhizes de lactaire. Cependant, dans ces dernières, l'ensemble des structures fongiques participent à la fixation des éléments minéraux absorbés alors que dans les premières, il semble que seules les structures les plus aptes à accumuler ces ions sont mises à contribution. Ce n'est donc sans doute pas tant une différence de capacité d'absorption des ions qui semble être en cause mais plutôt un phénomène de « dilution » des ions par le nombre de structures impliquées dans leur immobilisation.

Le calcium et l'azote sont également stockés dans des formations vacuolaires fongiques particulières : les granules de polyphosphates et les globules riches en azote. La concentration de phosphore et d'azote sous forme de granules et de globules est un phénomène connu (Strullu *et al.*, 1982 ; Strullu *et al.*, 1983 ; Kottke *et al.*, 1995). Cependant, certains auteurs

(Orlovich et Ashford, 1993) imputent à la préparation pour la microscopie électronique des échantillons, la formation des granules de polyphosphates. Les ectomycorhizes de *Cenococcum geophilum* renferment uniquement des granules de polyphosphates dans les hyphes du manteau et des globules azotés dans celles du réseau de Hartig. En revanche, les ectomycorhizes de *Lactarius subdulcis* contiennent les deux types de corpuscules à la fois dans le manteau et dans le réseau de Hartig. Kottke *et al.* (1994) ont montré une progression dans l'apparition des granules et des globules vacuolaires. C'est ainsi que dans les hyphes du champignon mycorhizien *Laccaria bicolor* soumises à une concentration élevée en aluminium pendant une durée allant de 3 à 8 jours, les granules de polyphosphates s'enrichissent en azote et changent d'aspect, correspondant alors à des globules azotés. Il semble donc que ces globules soient une réponse à la présence d'une dose massive d'aluminium. Dans notre cas, la concentration élevée en calcium disponible dans le sol pourrait induire la formation de ces globules azotés dans les vacuoles des hyphes. La présence ou l'absence de ces globules fongiques serait alors fonction du degré de résistance du champignon à la forte teneur en calcium et/ou de sa capacité à limiter l'absorption de cet ion. L'observation des granules de polyphosphates et des globules azotés dans les vacuoles des hyphes du manteau et du réseau de Hartig des ectomycorhizes de *Lactarius subdulcis* constituerait un stade intermédiaire.

Chez les deux ectomycorhizes étudiées, le cortex profond est relativement pauvre en éléments minéraux, bien que celui des mycorhizes de *Cenococcum geophilum* semble un peu plus riche en calcium et en azote que celui des mycorhizes de *Lactarius subdulcis*, ce qui confirme l'accumulation préférentielle des éléments minéraux dans les structures fongiques. Dans le cylindre central, les ions sont détectés principalement dans les jonctions cellulaires et dans les composés polyphénoliques présents dans le parenchyme médullaire. En revanche, les vaisseaux en contiennent peu. Seule la présence d'un peu d'azote a été révélée au niveau du liseré bordant la cavité des vaisseaux conducteurs chez les mycorhizes de *Cenococcum geophilum*. Or ce liseré pariétal renseigne sur les éventuels éléments acheminés via la sève brute vers le reste de l'arbre. Au printemps et au début de l'été, la croissance des parties racinaires et aériennes du Hêtre est active et nécessite de grandes quantités de nutriments. En revanche, à la fin de l'été, la croissance du Hêtre tend à se ralentir (Hoffman, 1972) et les besoins en nutriments deviennent moindres. Carisey (1990) a ainsi montré chez l'épicéa, que les concentrations minérales de la sève xylémique varient en fonction de la saison. Elles sont en général élevées en début de saison de végétation puis diminuent pour rester globalement stables jusqu'à la fin de la saison végétative.

Dans les deux mycorhizes, les tissus racinaires sont donc plus pauvres en ions que les structures fongiques. En revanche, les mycorhizes et les racines porteuses de mycorhizes ne

correspondant pas au même type racinaire, il n'est pas possible d'effectuer une comparaison entre les tissus racinaires de ces deux organes concernant leur richesse ionique, ce qui permettrait de mettre en évidence le rôle du champignon. Toutefois, l'étude de ces deux types d'organes (mycorhizes et racines porteuses de mycorhizes) a permis de relier l'anatomie et le comportement de ces organes avec leur fonction.

CONCLUSION :

Les résultats présentés ont permis de caractériser à plusieurs niveaux les deux modèles mycorhiziens étudiés ainsi que leurs racines porteuses :

- *Au niveau morphologique* : en été, dans la rendzine brunifiée, *Cenococcum geophilum* et *Lactarius subdulcis* établissent une symbiose ectomycorhizienne avec *Fagus sylvatica*. Les mycorhizes de *Cenococcum geophilum* représentent le type mycorhizien dominant parmi les associations mycorhiziennes observées sur le système racinaire du Hêtre. De plus, les deux mycorhizes se différencient par la présence ou l'absence de mycélium extramatriciel. Par ses capacités d'exploration du substrat plus importante, *Cenococcum geophilum* serait plus efficace dans la nutrition de la plante que le lactaire. La plus grande efficacité des mycorhizes à mycélium frangeant par rapport aux mycorhizes lisses a déjà été évoquée par divers auteurs (Voiry, 1981 ; Lei, 1988 ; Prévost, 1992). Les racines porteuses, bien que présentant des hyphes à leur surface, ne présentent pas la structure des ectomycorhizes.

- *Au niveau ultrastructural* : les deux mycorhizes présentent une ultrastructure générale similaire. Le manteau fongique enrobe la racine courte et un réseau de Hartig est progressivement mis en place entre les cellules corticales sur une épaisseur d'une à deux assises cellulaires. Toutefois, le manteau des ectomycorhizes de *Cenococcum geophilum* est moins épais que celui des ectomycorhizes de *Lactarius subdulcis* et ne se stratifie pas en un manteau externe et en un manteau interne comme celui formé par *Lactarius subdulcis*. De plus, chez les ectomycorhizes de *Lactarius subdulcis*, des laticifères ont été observés dans le manteau, de même qu'un Ascomycète qui est également présent dans le cortex profond des mycorhizes. Si du mycélium est présent à la surface des racines porteuses de mycorhizes, il n'y a cependant pas formation d'un manteau fongique. D'autre part, le cortex racinaire, dégénérescent, est envahi d'hyphes.

- *Au niveau cytochimique* : les structures pariétales fongiques et racinaires des deux mycorhizes sont de nature glycoprotéique. Cependant, les proportions polysaccharidique et protéique varient en fonction du partenaire fongique de la symbiose dans les différentes structures. Dans les racines porteuses, les parois des cellules du cortex sont davantage polysaccharidiques que protéiques. En revanche, la paroi épaissie des vaisseaux du xylème est très protéique. Le liseré pariétal qui borde leur cavité renferme une grande proportion de polysaccharides et de protéines.

- *Au niveau analytique* : globalement les tissus des mycorhizes de *Cenococcum geophilum* apparaissent plus riches en calcium et en azote que ceux des mycorhizes de *Lactarius subdulcis*. La situation inverse a été observée pour le silicium. Certaines structures (composés polyphénoliques, ciments, granules de polyphosphates et globules azotés fongiques) constituent des sites privilégiés de l'accumulation des éléments. De plus, les mycorhizes de *Cenococcum geophilum*, par la présence d'un mucilage à la surface de l'organe, sont plus aptes à fixer les éléments proches de la surface et ainsi à réguler leur transport vers l'intérieur de la racine. Les tissus des racines porteuses de mycorhizes sont très pauvres en éléments et la paroi interne des cellules de l'endoderme et du suber est soulignée par une couche de silice.

CHAPITRE I :

PLANCHES I A XI

ETUDES MORPHOLOGIQUE ET HISTOCHIMIQUE DES MYCORHIZES NATURELLES DE *Fagus sylvatica* L. EN ASSOCIATION AVEC *Cenococcum geophilum* L.

Site de prélèvement : **site de la Crédence, rendzine brunifiée forestière.**

Période de prélèvement : **été 1996.**

Coloration par le bleu de toluidine

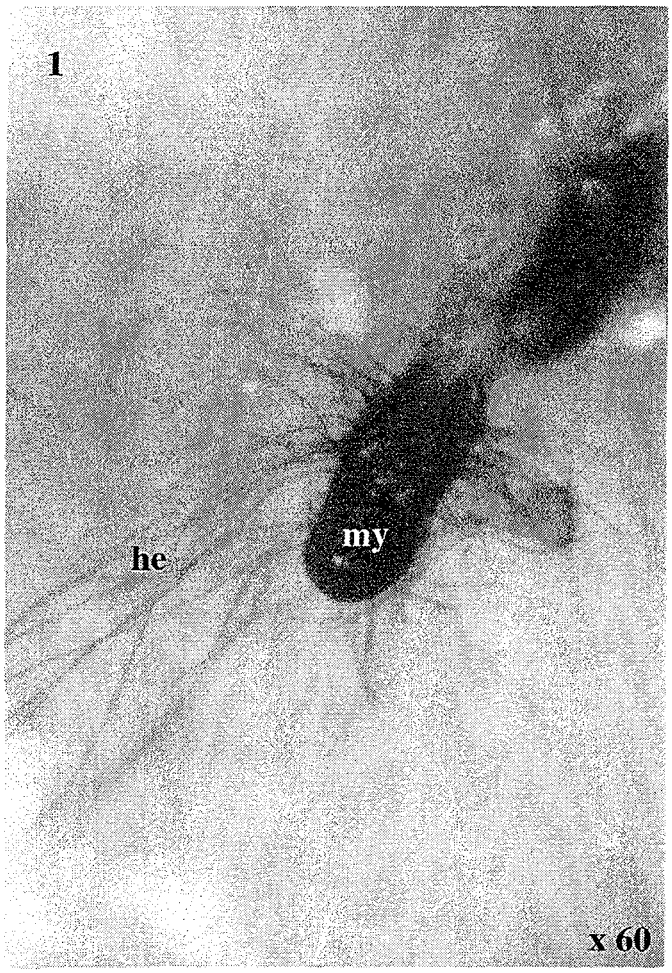
Figure 1 : Vue externe d'une mycorhize (my) monopodiale de *Cenococcum geophilum* de couleur noir charbon, présentant des hyphes extramatricielles (he) bien développées. x 60

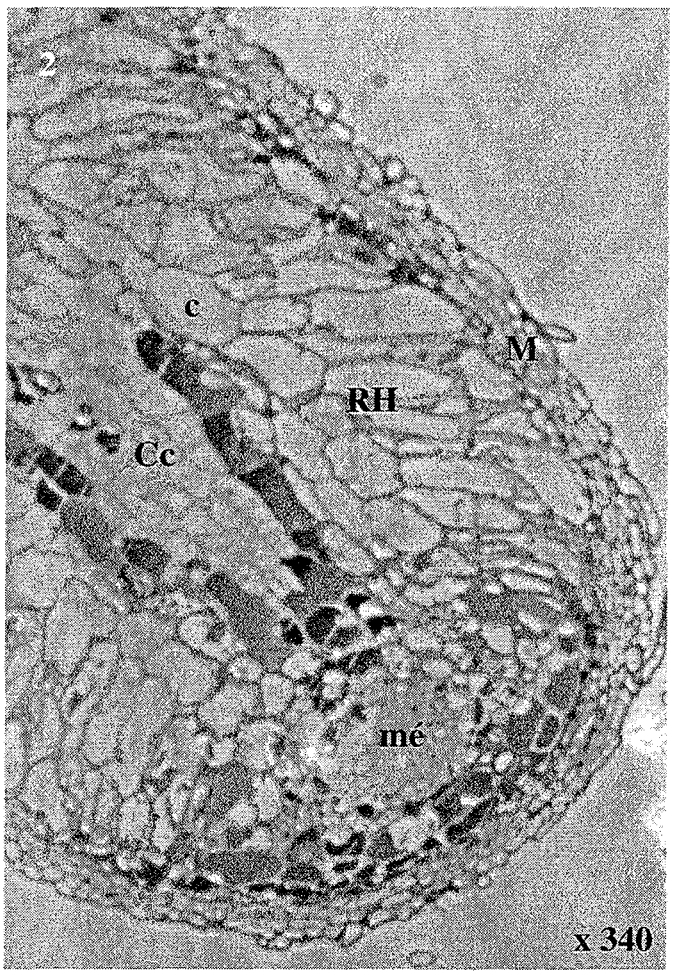
Figure 2 : Coupe longitudinale axiale d'une mycorhize de *Cenococcum geophilum* observée en microscopie photonique. Le manteau fongique (M) enrobe la totalité de la racine courte. Le champignon s'insère ensuite entre les cellules rhizodermiques, formant ainsi un réseau de Hartig (RH) continu et unisérié. Le cortex profond (c) est dépourvu de mycélium et est limité intérieurement par l'endoderme. Le cylindre central (Cc) ne comprend que des structures primaires. mé : méristème. x 340

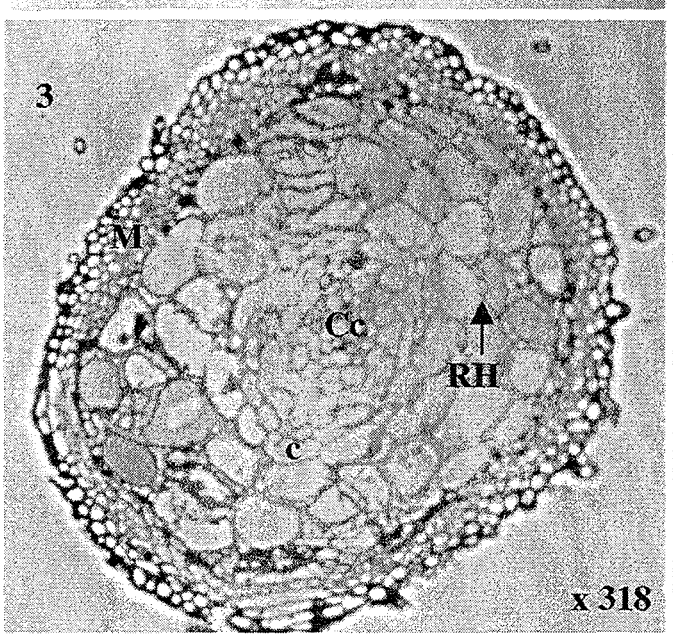
Figure 3 : Coupe transversale d'une mycorhize de *Cenococcum geophilum* observée en microscopie photonique. La surface du manteau fongique (M) est recouverte d'un matériel sombre. RH : réseau de Hartig ; c : cortex ; Cc : cylindre central. x 318

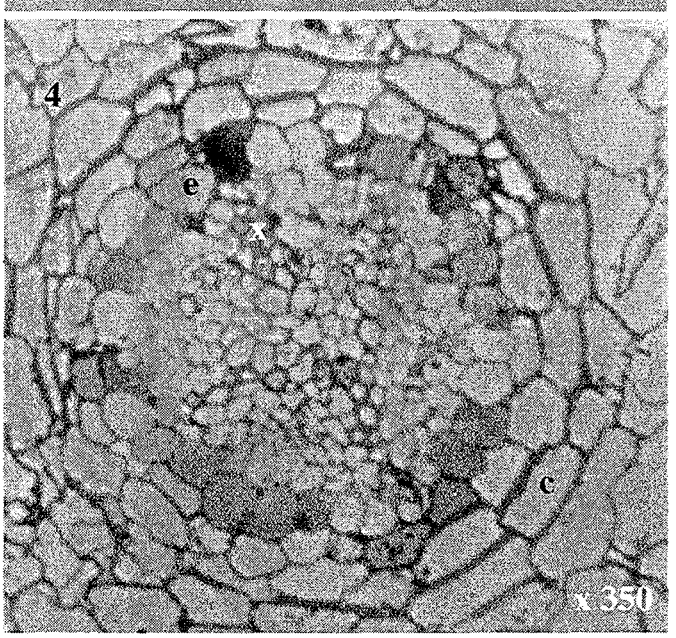
Figure 4 : Détail du cylindre central, en coupe transversale, d'une mycorhize de *Cenococcum geophilum* observée en microscopie photonique. L'endoderme (e) est reconnaissable aux composés polyphénoliques qu'il renferme. Il constitue la limite inférieure du cortex. Le cylindre central comprend quatre pôles ligneux (x). x 350

PLANCHE I









ETUDES MORPHOLOGIQUE ET HISTOCHIMIQUE DES MYCORHIZES NATURELLES DE *Fagus sylvatica* L. EN ASSOCIATION AVEC *Lactarius subdulcis* Fr., ss. Q., Lange

Site de prélèvement : **site de la Crédence, rendzine brunifiée forestière.**

Période de prélèvement : **été 1996.**

Coloration par le bleu de toluidine

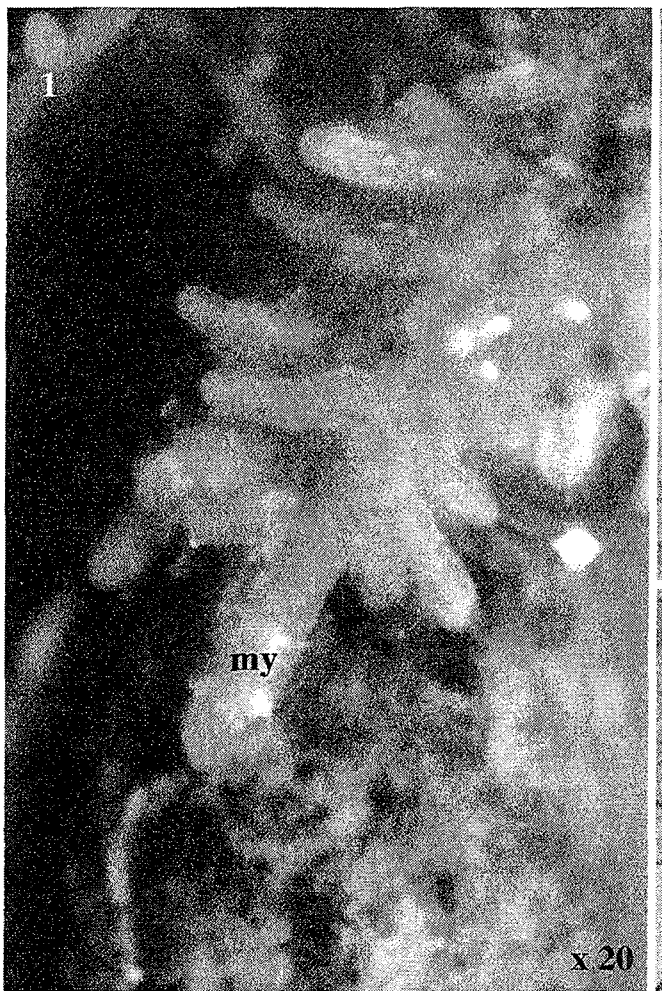
Figure 1 : Vue externe des mycorhizes (my) de *Lactarius subdulcis*. Ces mycorhizes sont de couleur jaune orangé et sont très ramifiées. Le manteau fongique est généralement lisse. x 20

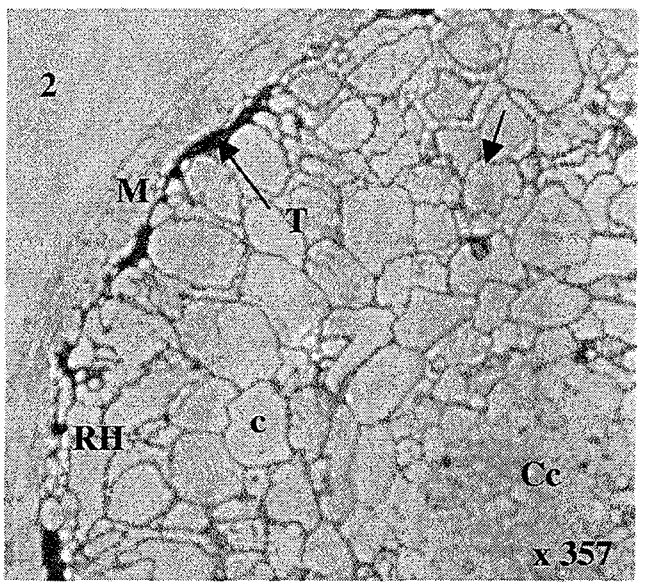
Figure 2 : Coupe transversale d'une mycorhize de *Lactarius subdulcis* observée en microscopie photonique. Un manteau fongique (M) épais s'organise autour de la racine courte. Les hyphes pénètrent ensuite dans la racine pour former un réseau de Hartig (RH) continu et unisérié. Le cortex (c) peut renfermer des hyphes (flèche). En revanche, le cylindre central (Cc) en est dépourvu. Il ne comprend que des structures primaires. T : composés polyphénoliques. x 357

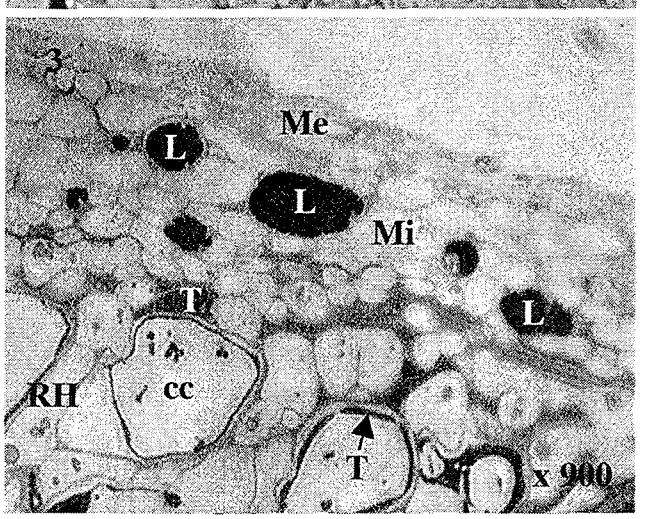
Figure 3 : Détail du manteau fongique d'une mycorhize de *Lactarius subdulcis,* en coupe longitudinale, observée en microscopie photonique. Le manteau fongique se subdivise en un manteau externe (Me) et en un manteau interne (Mi). Ce dernier renferme des cellules volumineuses remplies d'un matériel sombre, les laticifères (L). RH : réseau de Hartig ; cc : cellule corticale ; T : polyphénols. x 900

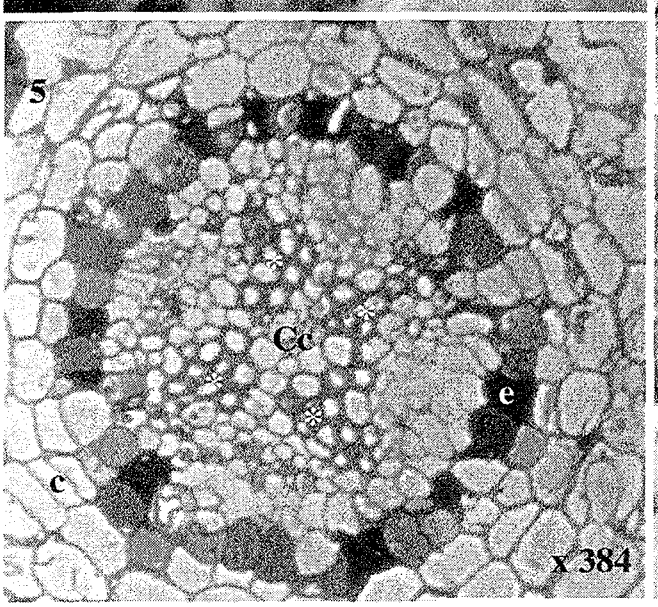
Figure 4 : Détail du manteau fongique d'une mycorhize de *Lactarius subdulcis,* en coupe longitudinale, observée en microscopie photonique. Les mycorhizes de *Lactarius subdulcis* sont associées à un Ascomycète (A) que l'on peut observer dans le manteau fongique. Il est reconnaissable aux corps de Woronin (w) qui bordent les septums des articles mycéliens ainsi que par sa taille plus importante. Me : manteau externe ; Mi : manteau interne ; T : composés polyphénoliques ; RH : réseau de Hartig ; C : cellule corticale. x 800

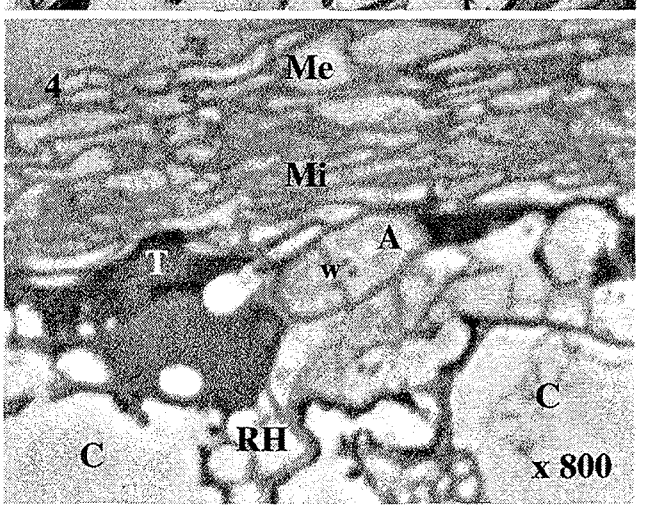
Figure 5 : Détail du cylindre central (Cc), en coupe transversale, d'une mycorhize de *Lactarius subdulcis* observée en microscopie photonique. La stèle comporte quatre pôles ligneux (*). c : cortex ; e : endoderme. x 384


1
my
x 20


2
M
T
RH
c
Cc
x 357


3
Me
L
L
Mi
L
T
RH
cc
T
x 900


5
Cc
e
c
x 384


4
Me
Mi
A
T
w
C
RH
C
x 800

ETUDES MORPHOLOGIQUE ET HISTOCHIMIQUE DES RACINES PORTEUSES DE MYCORHIZES DE *Fagus sylvatica* L.

Site de prélèvement : **site de la Crédence, rendzine brunifiée forestière.**

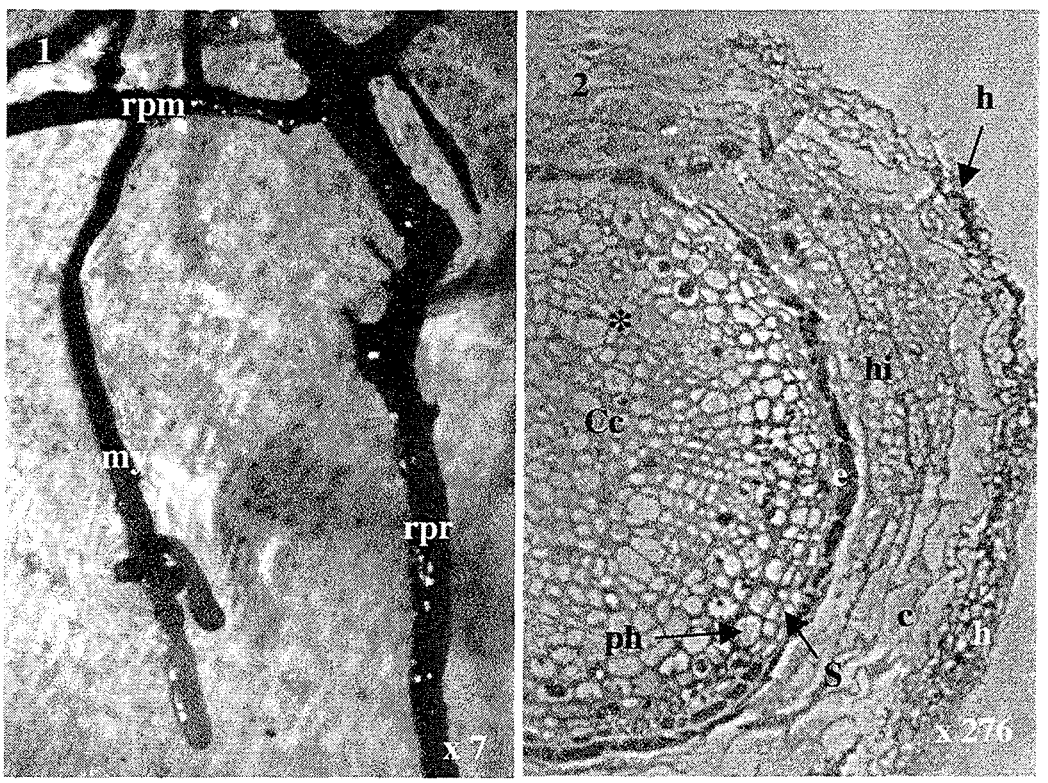
Période de prélèvement : **été 1996.**

Coloration par le bleu de toluidine

Figure 1 : Visualisation des différents prélèvements réalisés. Les mycorhizes (my), ici de *Lactarius subdulcis*, sont prélevées, de même que des portions de racines porteuses de mycorhizes (rpm). Ces racines sont elles-mêmes portées par des racines porteuses de ramifications (rpr). Ces dernières n'ont pas été étudiées. x 7

Figure 2 : Coupe transversale d'une racine porteuse de mycorhizes observée en microscopie photonique. Le cortex (c) montre des manifestations de dégénérescence et est recouvert par endroit par des hyphes (h). De plus, les cellules corticales sont envahies d'hyphes (hi). L'endoderme (e) est reconnaissable aux composés polyphénoliques qu'il renferme et délimite intérieurement le cortex. Le cylindre central (Cc) comporte des structures secondaires. ph : phellogène ; S : suber ; * : cambium. x 276

PLANCHE III



ETUDE ULTRASTRUCTURALE DES MYCORHIZES NATURELLES DE *Fagus sylvatica* L. EN ASSOCIATION AVEC *Cenococcum geophilum* L.

Site de prélèvement : **site de la Crédence, rendzine brunifiée forestière.**

Période de prélèvement : **été 1996.**

Double coloration acétate d'uranyle – citrate de plomb

Figure 1 : Les hyphes (h) du manteau fongique, observées en microscopie électronique à transmission, sont vacuolisées (v) et possèdent un cytoplasme relativement abondant. Les hyphes les plus externes sont recouvertes d'un matériel mucilagineux (mu). c : ciment ; T : composés polyphénoliques. x 7000

Figure 2 : Des granules denses (flèche) sont visibles dans les vacuoles (v) des hyphes du manteau. Cy : cytoplasme. x 50000

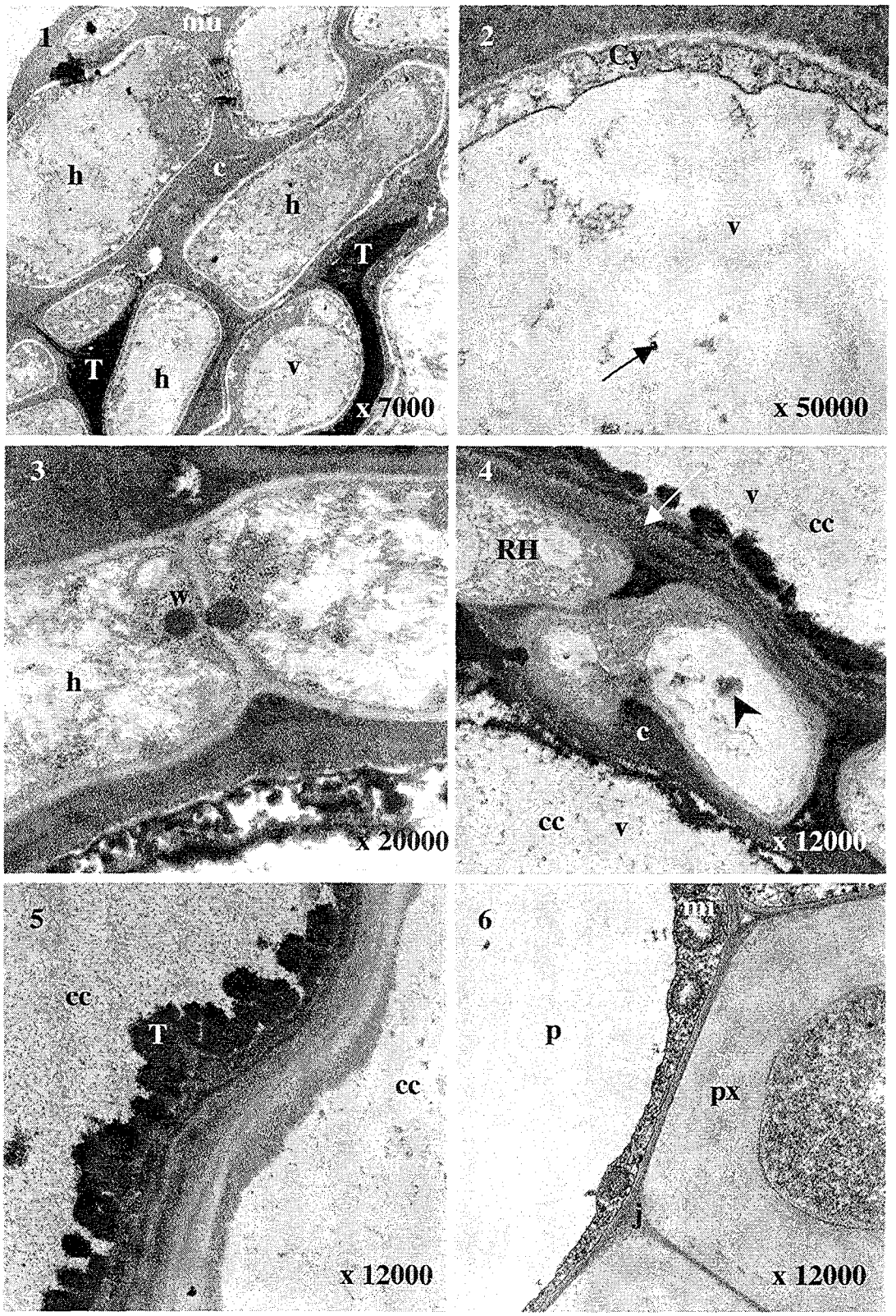
Figure 3 : Les corps de Woronin (w) présents au niveau des septums des hyphes (h) confirment l'appartenance du champignon à la classe des Ascomycètes. x 20000

Figure 4 : Les hyphes du réseau de Hartig (RH) sont en position intercellulaire et sont de petite section. Leur vacuole renferme des globules peu denses (tête de flèche). Les cellules corticales voisines (cc) sont caractérisées par une vacuole volumineuse (v) et un cytoplasme réduit périphérique (flèche). x 12000

Figure 5 : Le cortex profond des mycorhizes de *Cenococcum geophilum* est constitué de cellules (cc) de grande taille, dont les vacuoles renferment des composés polyphénoliques (T). x 12000

Figure 6 : Détail du cylindre central d'une mycorhize de *Cenococcum geophilum* observée en microscopie électronique à transmission. Certains vaisseaux montrent des restes de cytoplasme indiquant ainsi que leur maturation n'est pas complète. p : parenchyme médullaire ; px : paroi xylémienne ; j : jonction cellulaire ; mi : mitochondrie. x 12000

PLANCHE IV


1
mu
h
c
h
T
T
h
v
x 7000
2
Cy
v
x 50000
3
w
h
x 20000
4
v
cc
RH
c
cc
v
x 12000
5
cc
T
cc
x 12000
6
mu
p
px
j
x 12000

ETUDE ULTRASTRUCTURALE DES MYCORHIZES NATURELLES DE *Fagus sylvatica* L. EN ASSOCIATION AVEC *Lactarius subdulcis* Fr., ss. Q., Lange

Site de prélèvement : **site de la Crédence, rendzine brunifiée forestière.**

Période de prélèvement : **été 1996.**

Double coloration acétate d'uranyle – citrate de plomb

Figure 1 : Le manteau des mycorhizes de *Lactarius subdulcis* se subdivise en deux zones : un manteau externe (Me) formé d'hyphes mortes et un manteau interne (Mi) constitué d'hyphes vivantes. Le réseau de Hartig (RH) est continu et s'insère entre les cellules corticales (cc). c : ciment. x 3000

Figure 2 : Les vacuoles (v) des hyphes du manteau interne renferment soit des granules denses (flèche), soit des globules peu denses (tête de flèche). x 7000

Figure 3 : Détail d'une hyphe (h) du manteau interne formé par *Lactarius subdulcis*. La présence de dolipore (dp) au niveau des septums des articles mycéliens, confirme l'appartenance de ce champignon à la classe des Basidiomycètes. T : composés polyphénoliques. x 12000

Figure 4 : Le manteau interne (Mi) renferme des laticifères (L) caractéristiques des lactaires. c : ciment. x 7600

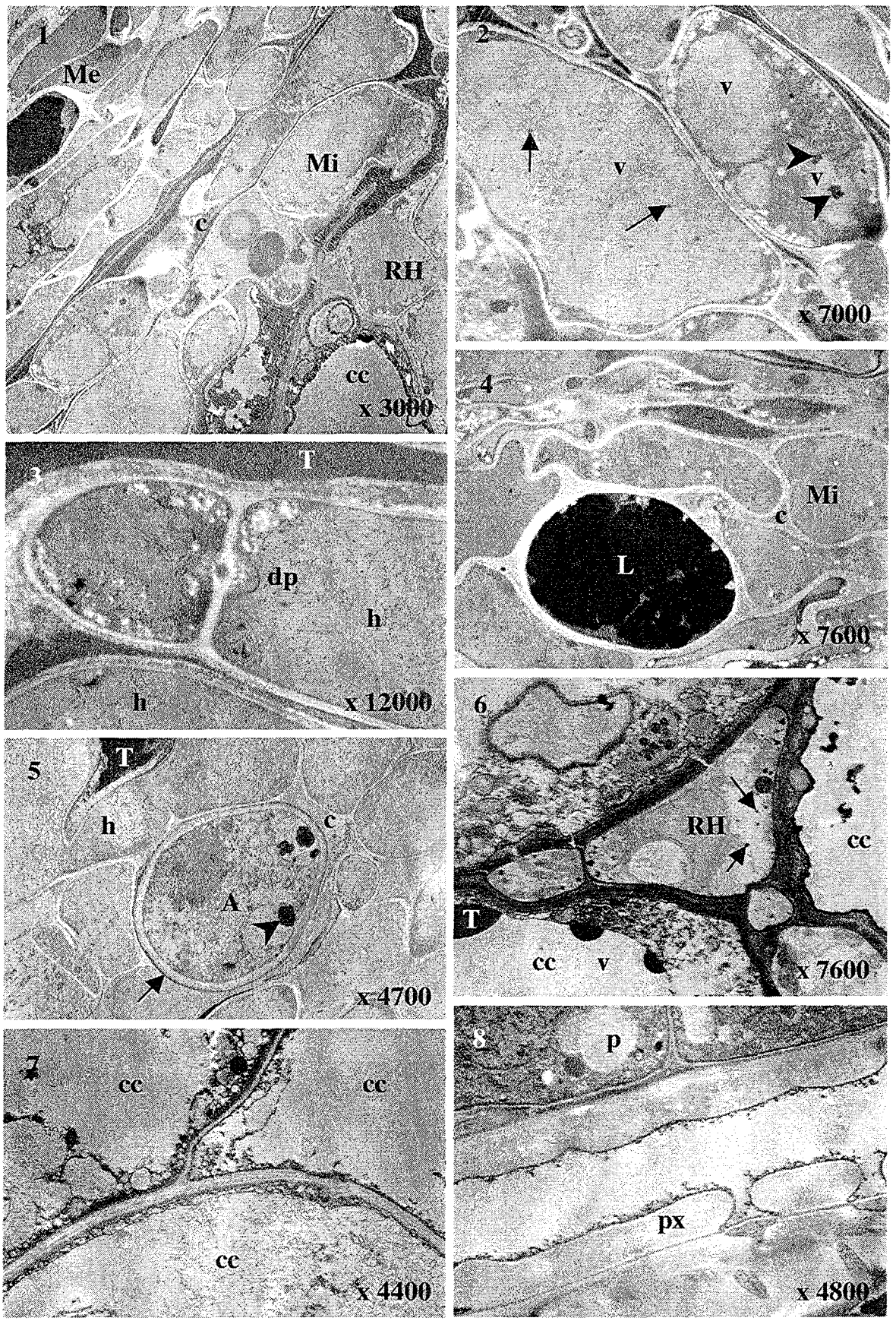
Figure 5 : Une hyphe de l'Ascomycète (A) associé aux hyphes (h) de *Lactarius subdulcis* est visible par sa taille plus importante. De plus, la couche externe de la paroi des hyphes de l'Ascomycète est dense (flèche), alors que celle des parois des hyphes de *Lactarius subdulcis* est claire. Cet Ascomycète peut renfermer des globules de grande taille (tête de flèche). T : composés polyphénoliques ; c : ciment interhyphal. x 4700

Figure 6 : Le réseau de Hartig (RH) est constitué d'hyphes de petite section. Des granules (flèches) sont visibles dans les vacuoles des hyphes. Les cellules corticales voisines (cc) présentent une vacuole volumineuse (v) qui renferme des composés polyphénoliques (T). x 7600

Figure 7 : Observation du cortex profond des mycorhizes de *Lactarius subdulcis* observées en microscopie électronique à transmission. cc : cellule corticale. x 4400

Figure 8 : Détail du cylindre central mycorhizien en coupe longitudinale. px : paroi xylémienne ; p : parenchyme médullaire. x 4800

PLANCHE V


1
Me
Mi
c
RH
cc
x 3000
2
v
v
v
x 7000
3
T
dp
h
h
x 12000
4
Mi
c
L
x 7600
5
T
h
c
A
x 4700
6
RH
cc
T
cc
v
x 7600
7
cc
cc
cc
x 4400
8
p
px
x 4800

ETUDE ULTRASTRUCTURALE DES RACINES PORTEUSES DE MYCORHIZES DE *Fagus sylvatica* L.

Site de prélèvement : **site de la Crédence, rendzine brunifiée forestière.**

Période de prélèvement : **été 1996.**

Double coloration acétate d'uranyle – citrate de plomb

Figure 1 : Les cellules du cortex (cc) des racines porteuses de mycorhizes sont envahies par des hyphes (hi) isolées ou reliées entre elles par un ciment (c). Les parois des cellules corticales présentent un épaississement important (ep). Flèche : globule azoté. x 3400

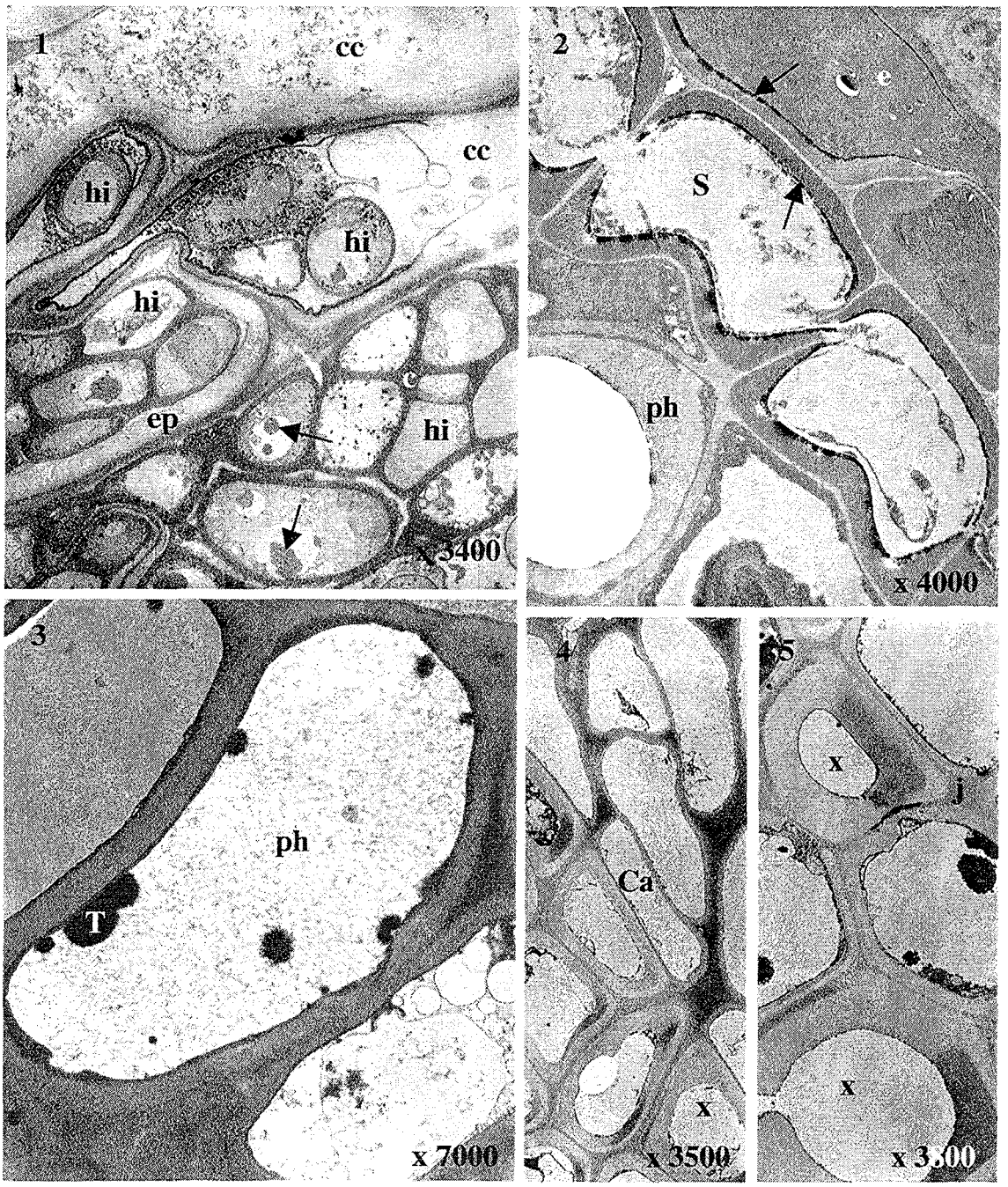
Figure 2 : La face interne de la paroi des cellules de l'endoderme (e) et du suber (S) sous-jacent est bordée par une couche de matériel dense (flèche). En revanche, cette couche n'est pas observée au niveau de la paroi des cellules du phellogène (ph). x 4000

Figure 3 : Détail d'une cellule du phellogène (ph) en cours de différenciation. T : composés polyphénoliques. x 7000

Figure 4 : Détail du cylindre central des racines porteuses de mycorhizes observées en microscopie électronique à transmission. Des structures secondaires sont visibles, notamment du cambium (Ca) qui produit du xylème (x) vers l'intérieur de l'organe. x 3500.

Figure 5 : Détail des vaisseaux du xylème (x) du cylindre central, en coupe transversale, observés en microscopie électronique à transmission. x 3800

PLANCHE VI


1
cc
cc
hi
hi
hi
ep
hi
x 3400
2
S
ph
x 4000
3
ph
T
x 7000
4
Ca
x
x 3500
5
x
j
x
x 3800

ETUDE CYTOCHIMIQUE DES MYCORHIZES NATURELLES DE *Fagus sylvatica* L. EN ASSOCIATION AVEC *Cenococcum geophilum* L.

Site de prélèvement : **site de la Crédence, rendzine brunifiée forestière.**

Période de prélèvement : **été 1996.**

Mise en évidence des polysaccharides par le test PATAg

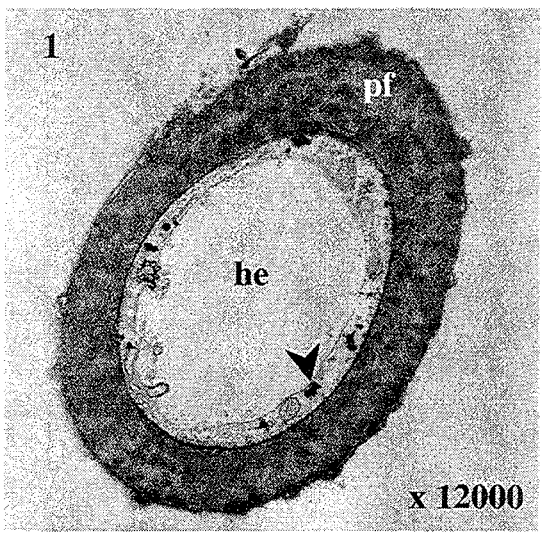
Figure 1 : Les hyphes extramatricielles (he) possèdent une paroi (pf) épaisse et très réactive au test PATAg et un cytoplasme renfermant des organites (mitochondries, réticulum endoplasmique) et du glycogène (tête de flèche) également très réactif. x 12000

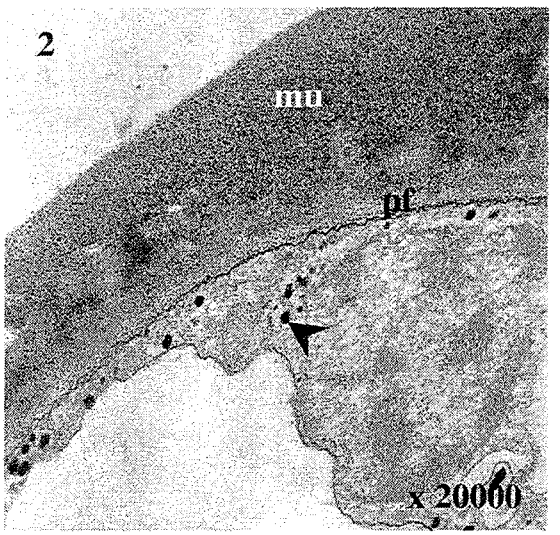
Figure 2 : Le mucilage (mu) de surface réagit fortement à ce test. En revanche, les parois (pf) des hyphes présentent un marquage plus faible. Le glycogène est fortement marqué (tête de flèche). x 20000

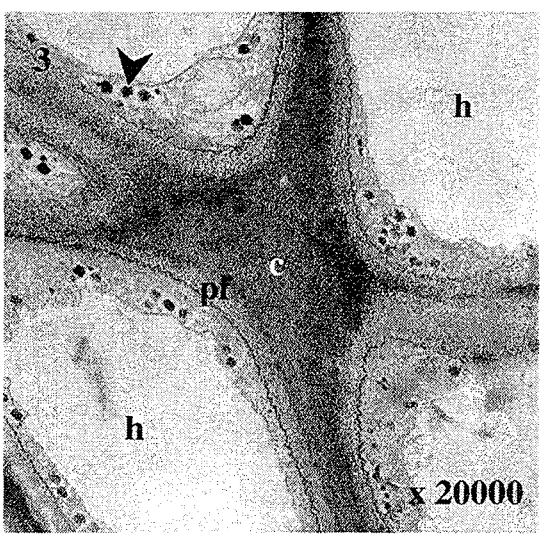
Figure 3 : Dans la zone interne du manteau, la paroi (pf) des hyphes (h) est peu réactive. En revanche, le ciment (c) réagit fortement, de même que le glycogène intracytoplasmique (tête de flèche). x 20000

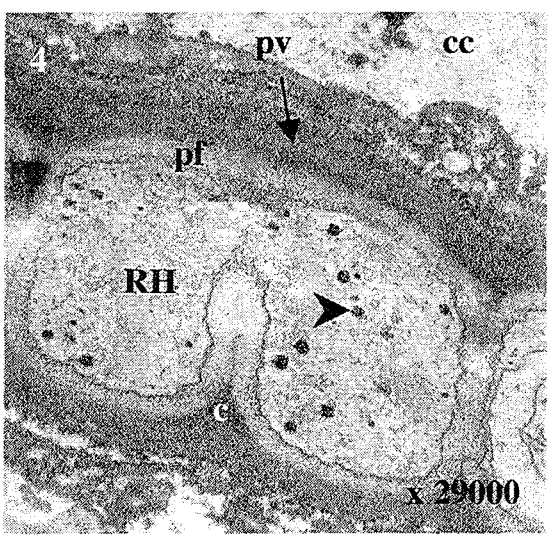
Figure 4 : Dans le réseau de Hartig (RH), les parois hyphales (pf) sont très peu marquées par le test PATAg. Les parois (pv) des cellules corticales voisines (cc) réagissent fortement. Il en est de même pour le ciment (c) reliant les deux partenaires. Le glycogène (tête de flèche) est bien visible. x 20000

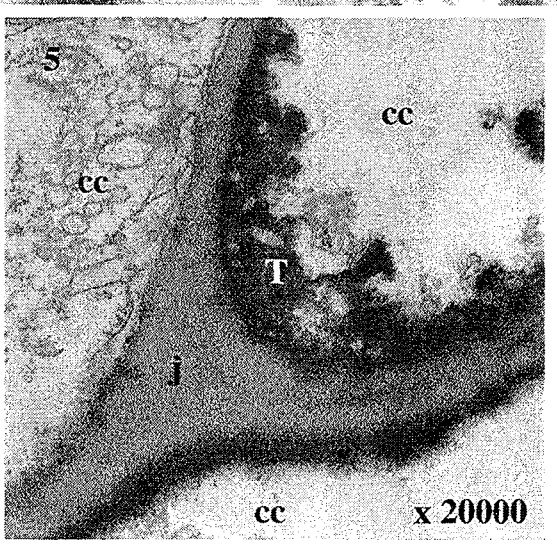
Figure 5 : Les parois des cellules du cortex (cc) et les jonctions cellulaires (j) présentent une intense réaction au test PATAg. T : composés polyphénoliques. x 20000


1
pf
he
x 12000


2
mu
pf
x 20000


3
h
c
pf
h
x 20000


4
pv
cc
pf
RH
c
x 29000


5
cc
cc
T
j
cc
x 20000

ETUDE CYTOCHIMIQUE DES MYCORHIZES NATURELLES DE *Fagus sylvatica* L. EN ASSOCIATION AVEC *Cenococcum geophilum* L.

Site de prélèvement : **site de la Crédence, rendzine brunifiée forestière.**

Période de prélèvement : **été 1996.**

Mise en évidence des protéines riches en cystine par le réactif de Gomori-Swift

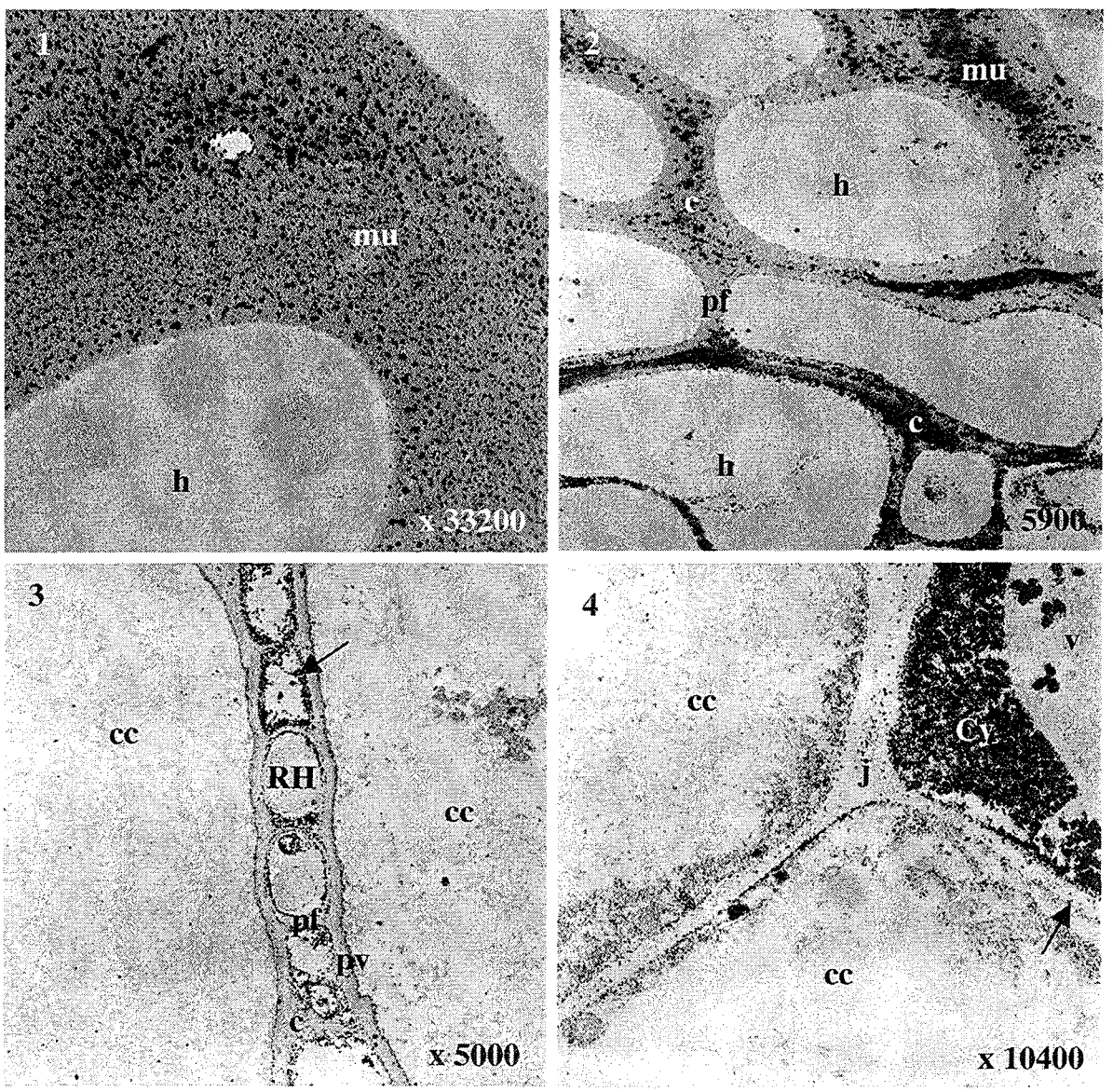
Figure 1 : Le mucilage (mu) recouvrant la surface des mycorhizes est fortement marqué par le réactif de Gomori-Swift. h : hyphe. x 33200

Figure 2 : Les parois (pf) des hyphes (h) du manteau fongique superficiel ne sont pas marquées par ce réactif. En revanche, le mucilage (mu) et le ciment interhyphal (c) présentent un marquage intense. x 5900

Figure 3 : Les parois (pf) des hyphes du réseau de Hartig (RH), celles (pv) des cellules corticales voisines (cc) ainsi que le ciment (c) ne sont pas ou peu marqués par le réactif de Gomori-Swift. Le cytoplasme (flèche) des hyphes est fortement réactif. x 5000

Figure 4 : Les structures (parois cellulaires et jonctions cellulaires) du cortex ne réagissent pas au réactif de Gomori-Swift. En revanche, le cytoplasme (Cy) des cellules présente un marquage très intense. La lamelle moyenne est également marquée (flèche). cc : cellule corticale ; j : jonction cellulaire. x 10400

PLANCHE VIII



ETUDE CYTOCHIMIQUE DES MYCORHIZES NATURELLES DE *Fagus sylvatica* L. EN ASSOCIATION AVEC *Lactarius subdulcis* Fr., ss. Q., Lange

Site de prélèvement : **site de la Crédence, rendzine brunifiée forestière.**

Période de prélèvement : **été 1996.**

Figure 1 : Test PATAg de mise en évidence des polysaccharides. Dans le manteau externe, la paroi (pf) des hyphes (h) réagit au test PATAg. Le ciment (c) est très fortement marqué. x 20000

Figure 2 : Dans le manteau interne, la couche externe de la paroi (pf) des hyphes (h) réagit faiblement au test PATAg alors que la couche interne ainsi que le ciment (c) qui les lie réagissent plus fortement. Le glycogène montre également une forte réaction. x 30000

Figure 3 : Les parois des laticifères (L) ne sont pas marquées par le test PATAg. En revanche, un léger marquage souligne le latex. h : hyphe. x 12000

Figure 4 : Dans le réseau de Hartig (RH), la paroi des hyphes (pf) et des cellules corticales voisines (pv) réagissent positivement au test PATAg. Le ciment (c) est très marqué, de même que le glycogène (flèche). x 20000

Figure 5 : Les parois des cellules corticales (cc) et les jonctions cellulaires (j) ne sont pas marquées par le test PATAg. Les vacuoles des cellules peuvent renfermer des polyphénols (flèche). x 4400

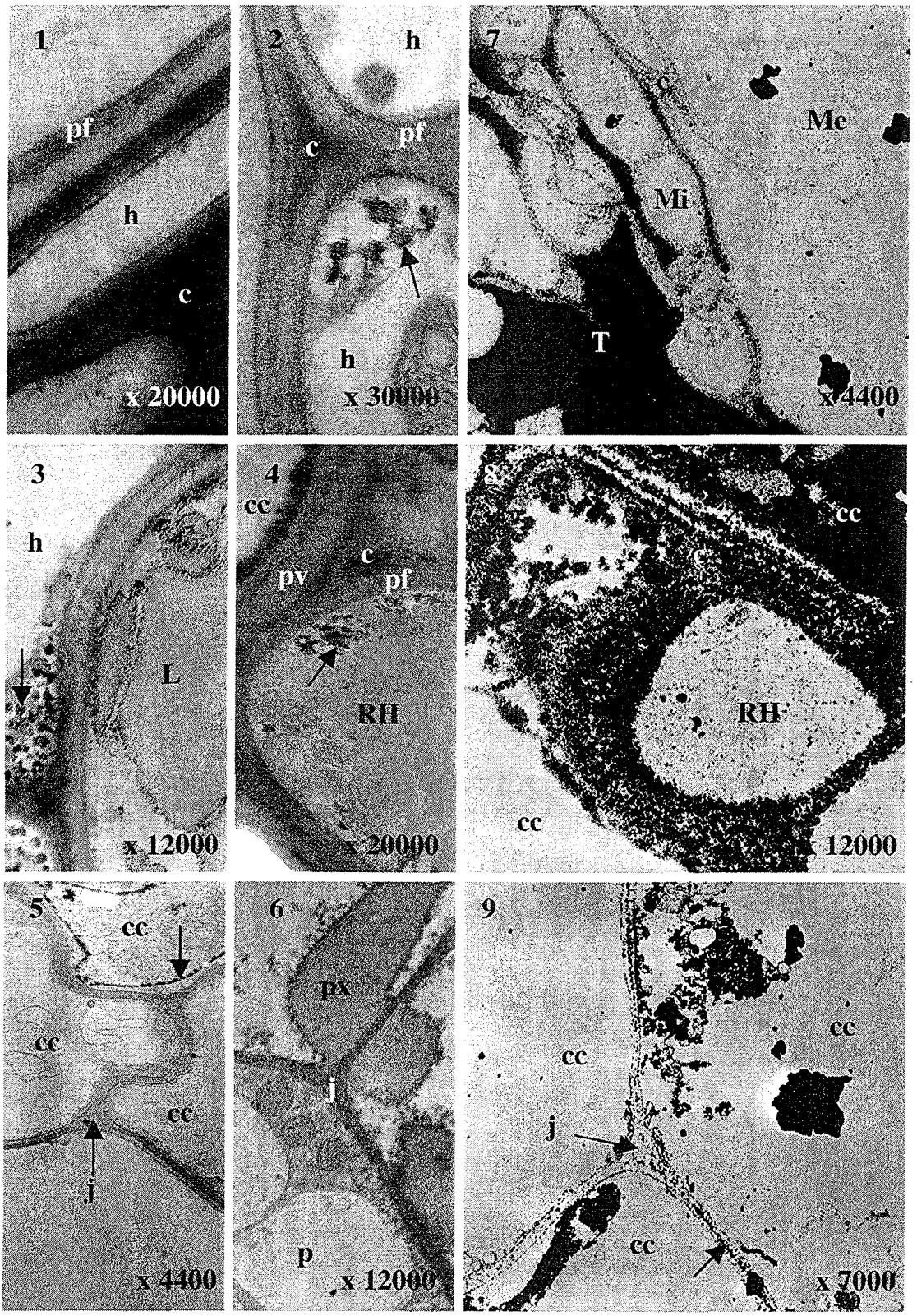
Figure 6 : Les structures du cylindre central des mycorhizes de *Lactarius subdulcis* sont faiblement réactives au test PATAg. p : parenchyme ; px : paroi xylémienne ; j : jonction cellulaire. x 12000

Figure 7 : Mise en évidence des protéines riches en cystine par le réactif de Gomori-Swift. Dans le manteau externe (Me), le marquage est très discret. Les parois des hyphes du manteau interne (Mi) réagissent à ce réactif. Le marquage est toutefois plus intense à proximité des cellules corticales. T : composés polyphénoliques. x 4400

Figure 8 : Les parois des hyphes du réseau de Hartig (RH) et des cellules corticales (cc) ainsi que le ciment (c) réagissent fortement au réactif de Gomori-Swift. x 12000

Figure 9 : Les parois des cellules (cc) du cortex profond ne sont pas marquées. En revanche, la lamelle moyenne présente un intense marquage (flèche). Les jonctions cellulaires (j) ne réagissent pas au test de mise en évidence des protéines riches en cystine. x 7000

PLANCHE IX


1
pf
h
c
x 20000
2
h
c
pf
h
x 30000
7
c
Me
Mi
T
x 4400
3
h
L
x 12000
4
cc
c
pv
pf
RH
x 20000
8
cc
c
RH
cc
x 12000
5
cc
cc
cc
j
x 4400
6
px
j
p
x 12000
9
cc
cc
j
cc
x 7000

ETUDE CYTOCHIMIQUE DES RACINES PORTEUSES DE MYCORHIZES DE *Fagus sylvatica* L.

Site de prélèvement : **site de la Crédence, rendzine brunifiée forestière.**

Période de prélèvement : **été 1996.**

Figure 1 : Test PATAg de mise en évidence des polysaccharides. Les parois (pv) des cellules végétales (cc) et celles (pf) des hyphes intracellulaires (h) réagissent à ce test. x 4800

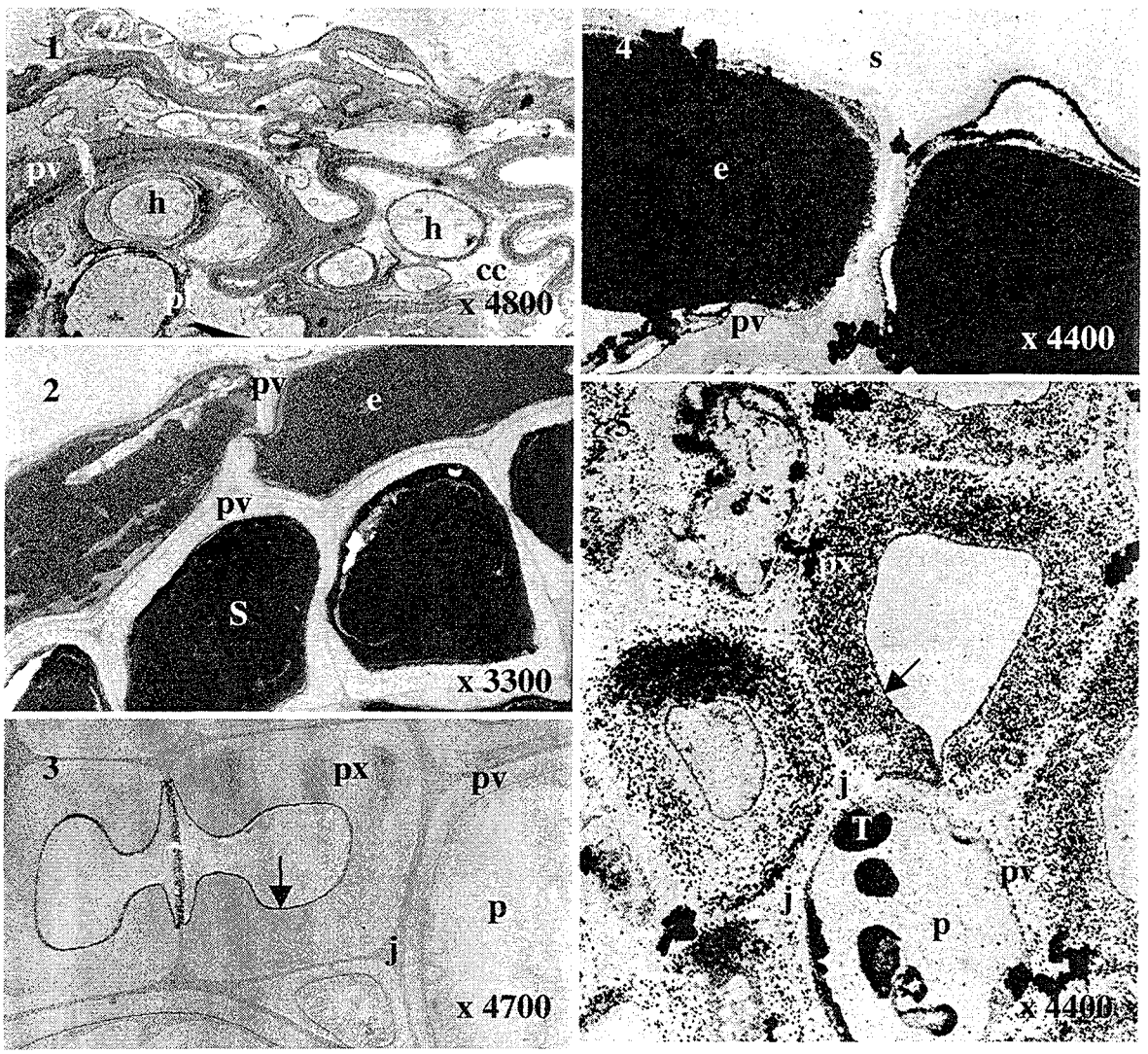
Figure 2 : Les parois (pv) des cellules de l'endoderme (e) et du suber (S) ne sont pas marquées par le test PATAg. Il est difficile de conclure sur la réactivité des composés polyphénoliques contenus dans ces cellules même si une différence de densité est observée. x 3300

Figure 3 : Le liseré pariétal (flèche) bordant la cavité des vaisseaux du xylème ainsi que la couche pariétale persistant entre ces vaisseaux sont réactifs au test PATAg. En revanche, les parois épaissies des vaisseaux (px), les parois des cellules du parenchyme (pv) ne montrent aucun marquage. Les jonctions cellulaires (j) réagissent peu. x 4700

Figure 4 : Mise en évidence des protéines riches en cystine par le réactif de Gomori-Swift. Les parois (pv) des cellules de l'endoderme (e) ne réagissent pas à ce réactif. s : surface. x 4400

Figure 5 : Les parois épaisses des vaisseaux du xylème (px) et le liseré pariétal qui borde leur cavité (flèche) sont fortement marqués par le réactif de Gomori-Swift. Les parois des cellules du parenchyme (pv) et les jonctions cellulaires (j) ne sont pas réactives. T : composés polyphénoliques. x 4400

PLANCHE X


1
pv
h
h
cc
x 4800
4
s
e
pv
x 4400
2
pv
e
pv
S
x 3300
3
px
pv
p
j
x 4700
px
j
T
j
p
pv
x 4400

ETUDE MICROANALYTIQUE : SPECTRES REPRESENTATIFS DE QUELQUES STRUCTURES ANALYSEES

Techniques d'analyses utilisées : **EELS, Electron Energy Loss Spectroscopy**
EDXS, Energy Dispersive X-ray Spectroscopy

Figure 1 : Formations denses présentes en surface des mycorhizes de *Cenococcum geophilum* récoltées dans la rendzine brunifiée. Ces formations correspondent soit à du quartz (silicium cristallisé) soit à de la silice (silicium sous forme amorphe). mu : mucilage ; h : hyphe. x 9500

Spectre 1a : Spectre EDX effectué sur des cristaux de quartz ou sur de la silice.

Figure 2 : Hyphes (h) du manteau interne d'une mycorhize de *Lactarius subdulcis* récoltée dans la rendzine brunifiée. Certaines hyphes sont localisées dans les plages de composés polyphénoliques (T). Des granules denses, à contours réguliers sont visibles dans la vacuole d'une hyphe (flèche). x 2400

Spectre 2a : Spectre EEL effectué sur une plage de composés polyphénoliques.
Spectre 2b : Spectre EEL réalisé sur un granule dense.

Figure 3 : Certaines hyphes (h) de la zone interne du manteau des mycorhizes de *Cenococcum geophilum* prélevées dans le sol podzolique, en été, renferment des globules vacuolaires à contours flous (tête de flèche). x 2400

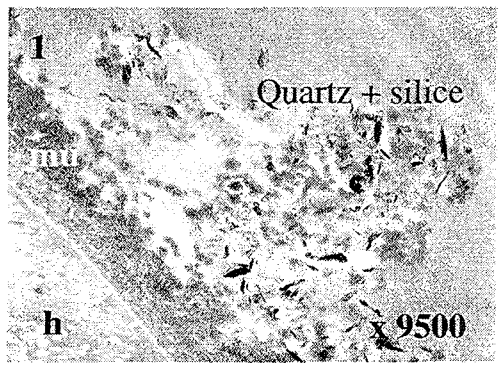
Spectre 3a : Spectre EEL réalisé sur un globule.

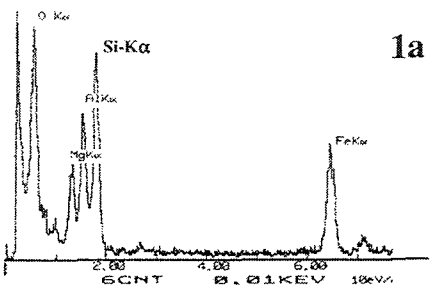
Figure 4 : Cellules de l'endoderme (e) et du suber (S) d'une racine porteuse de mycorhizes récoltée dans la rendzine brunifiée, en été. Leur paroi est soulignée intérieurement par une couche de matériel dense (flèche). x 3000

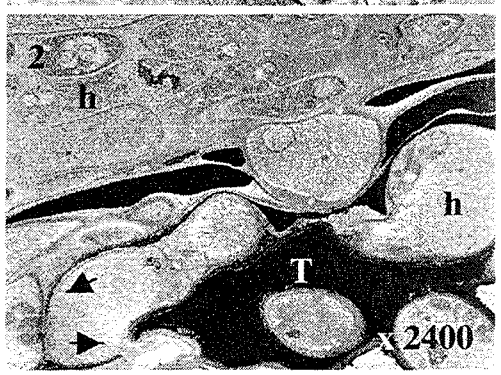
Spectre 4a : Spectre EEL effectué sur la couche de matériel dense.

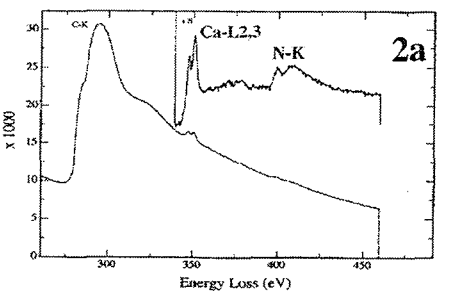
Figure 5 : Cartographie X de l'élément silicium réalisée au niveau de l'endoderme (e) et du suber (S) d'une racine porteuse de mycorhizes mettant en évidence une couche continue de silice correspondant à la couche sombre observée dans la figure 4. x 3000

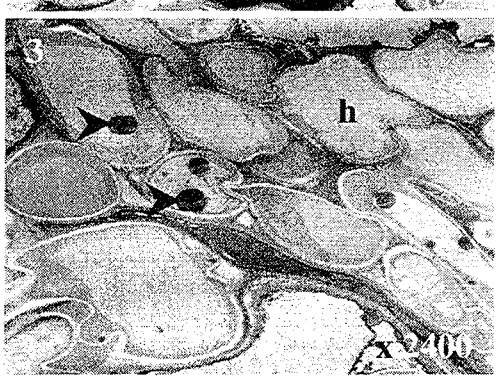
PLANCHE XI

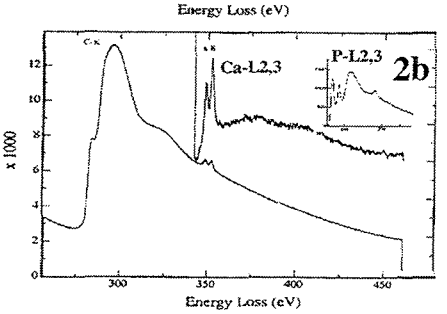

1
Quartz + silice
h
x 9500

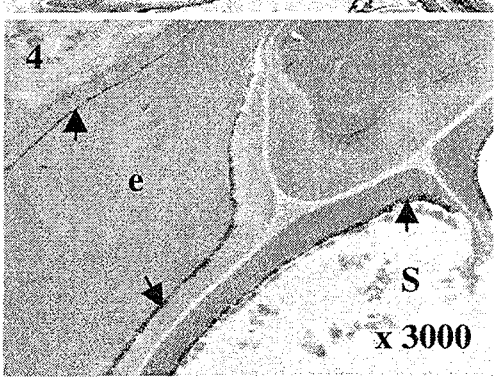

O Kα
Si-Kα
Al Kα
Mg Kα
Fe Kα
1a
2.00
4.00
6.00
6CNT
0.01KEV

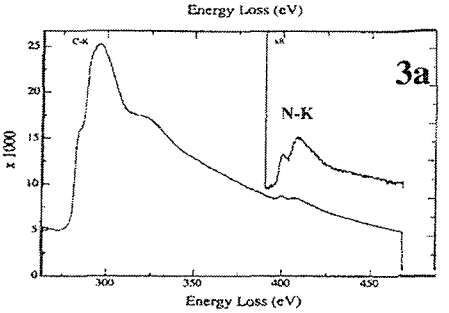

2
h
h
T
x 2400

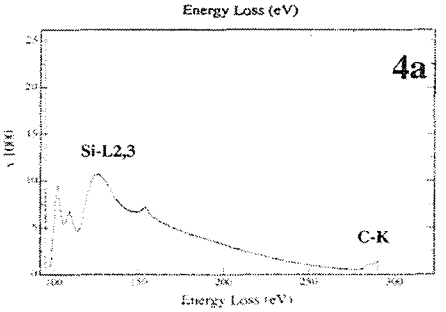

C-K
Ca-L2,3
N-K
2a
x 1000
Energy Loss (eV)

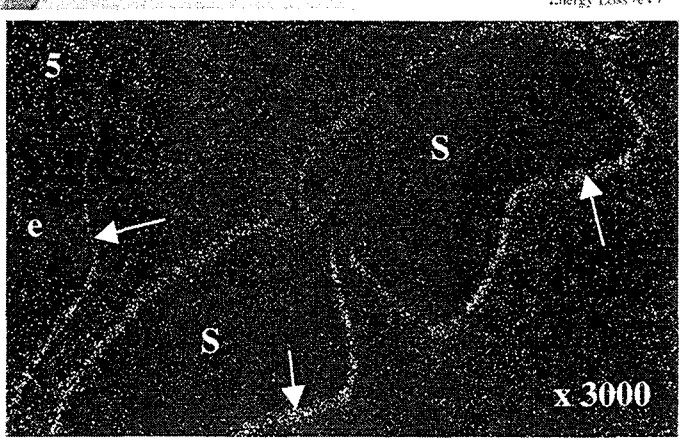

3
h
x 2400


C-K
Ca-L2,3
P-L2,3
2b
x 1000
Energy Loss (eV)


4
e
S
x 3000


C-K
N-K
3a
x 1000
Energy Loss (eV)


4a
Si-L2,3
C-K
Energy Loss (eV)


5
S
e
S
x 3000

CHAPITRE II :

LES COUPLES MYCORHIZIENS ET LEURS RACINES PORTEUSES PENDANT LA PERIODE ESTIVALE SUR LE SOL PODZOLIQUE.

INTRODUCTION :

La première partie de ce travail a permis de définir deux modèles mycorhiziens ainsi que leur racines porteuses, pendant la période estivale et dans un type de sol particulier.

Les mycorhizes formées l'une par un Ascomycète et l'autre par un Basidiomycète présentent, dans le sol calcaire, une organisation similaire à celle des ectomycorhizes.

De nombreuses études (Kottke et Oberwinkler, 1986 ; Lei, 1988 ; Boutekrabt *et al.*, 1990 ; Pargney et Leduc, 1990 ; Boutekrabt et Pargney, 1991) ont révélé la bipartition du manteau fongique en une zone externe morte et une zone interne vivante. Le manteau des mycorhizes à *Lactarius subdulcis* est conforme à cette organisation. Dans le cas des mycorhizes à *Cenococcum geophilum*, l'absence d'une zone externe dans le manteau est une conséquence de l'existence d'un mucilage protecteur épais en surface.

Dans la plupart des ectomycorhizes, le réseau de Hartig intercellulaire est continu et unisérié (Kottke et Oberwinkler, 1986 ; Prévost et Pargney, 1995) et ne s'étend généralement pas au-delà de la deuxième assise de cellules corticales. Cependant, il peut être plurisérié comme dans l'ectomycorhize formée chez le Pin par la souche mutante surproductrice d'auxine d'*Hebeloma cylindrosporum* (Gea, 1995).

L'étude de l'organisation et du fonctionnement de mycorhizes naturelles nécessite de prendre en compte les conditions (température, précipitations) du milieu dans lequel les organes ont été récoltés. Les mycorhizes sont préférentiellement présentes dans les sols pauvres en éléments nutritifs où elles jouent alors un grand rôle dans l'amélioration de la nutrition minérale de leur hôte (Gay et Garrec, 1980 ; Smith et Read, 1997). Toutefois, les associations mycorhiziennes peuvent se développer dans des sols relativement riches en nutriments (Le Tacon, 1976 ; Clément *et al.*, 1977) où elles participent même au recyclage des éléments minéraux à partir de la matière organique d'origine végétale (Dighton, 1991 ; Finlay *et al.*, 1992) et donc à l'évolution du sol. Si les mycorhizes influent sur leur milieu, les caractéristiques (températures, humidité, pH, réserve minérale) de leur habitat peuvent induire des modifications de ces organes symbiotiques. En effet, les études de Metzler et Oberwinkler (1987) et de Meideros *et al.* (1994) ont montré que selon le pH du sol, une diminution ou une augmentation du taux de mycorhization du système racinaire des plantes peut être observée. De même, une humidité du sol trop importante (Theodorou, 1978 ; Bougher et Malajczuk, 1990) ou trop faible (Harvey *et al.*, 1978 ; Bougher et Malajczuk, 1990) ne permet pas une bonne mycorhization des plantes. Toutefois, seules les études de Metzler et Oberwinkler (1987) et de Kieliszewska *et al.*

(1998) se sont attachées à étudier les modifications plus fines des organes symbiotiques en fonction de différents paramètres.

Il nous a donc semblé intéressant d'étudier ces aspects de la relation symbiotique. Pour cela, les modèles mycorhiziens caractérisés dans la rendzine, ont été recherchés dans un deuxième sol, acide et pauvre en nutriments correspondant à un sol podzolique. Leur étude au niveau cytologique, ultrastructural, cytochimique et la détermination des sites d'accumulation de certains éléments du sol devraient permettre d'observer l'effet du sol sur les mycorhizes étudiées.

RESULTATS :

Les mycorhizes à *Cenococcum geophilum* et à *Lactarius subdulcis* ainsi que des racines porteuses ont été prélevées dans un sol acide podzolique pauvre en éléments minéraux (se référer aux tableaux 3 et 4 présentés dans les résultats du chapitre I), pendant la période estivale de végétation.

I. ETUDE MORPHOLOGIQUE

A. LES MYCORHIZES DE *CENOCOCCUM GEOPHILUM*

Alors que dans la rendzine elles dominaient sur le système racinaire du Hêtre par leur abondance, dans ce sol acide leur nombre est réduit et elles se présentent sous la forme de petits amas localisés. Des formes de résistance ou sclérotes (Planche XII, Fig. 1), sont également associées aux mycorhizes observées. Il s'agit de sphères noires formées d'un amas d'hyphes compactes, (Planche XII, Fig. 2), desquelles émerge un mycélium extramatriciel bien développé (Planche XII, Fig. 1).

Les critères morphologiques des mycorhizes restent globalement inchangés par rapport à ceux des mycorhizes prélevées dans la rendzine, (Planche XII, Fig. 3), c'est-à-dire que les mycorhizes sont de couleur noir charbon et peu ramifiées. Leur taille est toutefois supérieure car elle atteint 2 mm en moyenne et le mycélium extramatriciel qu'elles développent est plus abondant qu'au niveau des échantillons provenant de la rendzine.

B. LES MYCORHIZES DE *LACTARIUS SUBDULCIS*

La proportion de ces mycorhizes est également inversée puisqu'elles représentent maintenant le type mycorhizien dominant par rapport à l'ensemble des mycorhizes observées sur le système racinaire du Hêtre, dans le sol podzolique.

L'aspect externe de ces mycorhizes ne varie pas dans le sol acide. Ce sont des mycorhizes de couleur jaune orangé, très ramifiées et dépourvues de mycélium extramatriciel. Les différences se situent au niveau de leur taille car elles peuvent atteindre 1 cm.

C. LES RACINES PORTEUSES DE MYCORHIZES DE *FAGUS SYLVATICA*

Ces racines porteuses présentent un aspect morphologique identique à celui décrit pour les racines prélevées dans la rendzine.

II. ETUDE HISTOLOGIQUE

A. LES MYCORHIZES DE *CENOCOCCUM GEOPHILUM*

Des coupes transversales observées en microscopie photonique (Planche XII, Fig. 4), montrent un manteau plus ou moins lâche, composé de cinq à six couches d'hyphes, et recouvert d'un mucilage épais et sombre. Des composés polyphénoliques séparent le manteau du cortex.

Le cortex ne montre pas de réseau de Hartig (Planche XII, Fig. 4). Les cellules corticales externes sont plus ou moins aplaties et de forme irrégulière et elles renferment des hyphes intracellulaires.

Le reste du cortex est constitué de cellules en général volumineuses plus ou moins aplaties (Planche XII, Fig. 4).

Le cylindre central présente les mêmes caractéristiques que celui des racines primaires c'est-à-dire qu'il est réduit et ne présente pas de tissus secondaires.

B. LES MYCORHIZES DE *LACTARIUS SUBDULCIS*

Les mycorhizes à *Lactarius subdulcis* provenant du sol acide ne présentent pas de modifications particulières de leur organisation histologique comparée aux mycorhizes récoltées dans le sol calcaire à cette époque de l'année.

C. LES RACINES PORTEUSES DE MYCORHIZES DE *FAGUS SYLVATICA*

Dans le sol podzolique, les racines porteuses de mycorhizes montrent un aspect similaire à celui des racines porteuses récoltées dans la rendzine.

III. ETUDE ULTRASTRUCTURALE

A. LES MYCORHIZES DE *CENOCOCCUM GEOPHILUM*

Les mycorhizes à *Cenococcum geophilum*, (Planche XIII, Fig. 1), possèdent un manteau fongique relativement épais principalement constitué d'hyphes vivantes, excepté celles de la couche superficielle qui sont enrobées dans un mucilage dense et abondant. Le ciment interhyphal est épais. Des plages polyphénoliques sont visibles dans la partie la plus interne du manteau au contact des cellules racinaires (Planche XIII, Fig. 1, 2 et 3). Ces polyphénols apparaissent striés ou non et contiennent parfois des hyphes. Les hyphes du manteau renferment des globules vacuolaires volumineux à contours plus ou moins flous ainsi que des petites vésicules cytoplasmiques claires (Planche XIII, Fig. 2).

Les hyphes présentes dans le cortex sont exclusivement intracellulaires (Planche XIII, Fig. 3). Il n'y a donc pas formation d'un réseau de Hartig. En pénétrant dans les cellules corticales, les hyphes lysent la paroi cellulaire végétale et repoussent le plasmalemme et le cytoplasme au fur et à mesure de leur progression. Le contour des hyphes, (Planche XIII, Fig. 4), est souligné par une couche de matériel dense correspondant au plasmalemme, au cytoplasme et au tonoplaste de la cellule végétale. Les vacuoles de ces hyphes, (Planche XIII, Fig. 4), contiennent soit des globules identiques à ceux observés dans le manteau soit des granules (Planche XIII, Fig. 3). Les cellules corticales sont vacuolisées et montrent un cytoplasme périphérique qui renferme des organites notamment des mitochondries.

La dernière couche de cellules corticales est dépourvue de champignon (Planche XIII, Fig. 5). Les cellules endodermiques sont reconnaissables à leurs composés polyphénoliques denses accumulés dans leur vacuole. Le cylindre central, (Planche XIII, Fig. 6), ne présente pas de formations secondaires et est exempt de champignon. Certaines cellules du parenchyme renferment de gros globules denses correspondant à des composés polyphénoliques.

B. LES MYCORHIZES DE *LACTARIUS SUBDULCIS*

L'ultrastructure des mycorhizes à *Lactarius subdulcis* ne semble pas présenter de modifications par rapport à celle observée chez les mycorhizes récoltées dans le sol calcaire.

Le manteau très épais est organisé en un manteau externe formé d'hyphes mortes et en un manteau interne constitué d'hyphes vivantes (Planche XIV, Fig. 1). La présence d'un manteau intermédiaire est également observée chez les jeunes mycorhizes (donnée non

	CONSTITUANTS	NATURE CHIMIQUE	
		SOL PODZOLIQUE	
		Polysaccharides	Protéines
Surface de la mycorhize	Mucilage	+++	++
Manteau externe	Parois fongiques	+++	++
	Ciment	-	-
Manteau interne	Parois fongiques	+++	++
	Ciment	-	++
	Glycogène	+++	-
Hyphes intracellulaires	Parois fongiques	++	+
	Parois des cellules corticales voisines	++	+
	Ciment	/	/
	Glycogène	+++	-
Cortex	Parois des cellules corticales	+(+)	+
	Jonctions cellulaires	+(+)	+
	Parois des cellules endodermiques	-	-
Cylindre central	Parois des cellules du péricycle	-	-
	Parois des cellules du parenchyme	++	+
	Jonctions cellulaires	+	-
	Parois lignifiées des vaisseaux	-	-
	Liseré interne des parois du xylème	++	++

Tableau 11 : Organisation et nature glycoprotéique des constituants formant les structures présentes dans les mycorhizes de *Fagus sylvatica* / *Cenococcum geophilum* prélevées en été, dans le sol podzolique.

montrée). La présence de laticifères ainsi que celle du champignon ascomycète (Planche XIV, Fig. 2), a été remarquée dans le manteau interne. Les globules volumineux, (Planche XIV, Fig. 3), ainsi que les granules sombres plus petits et à contours réguliers, (Planche XIV, Fig. 2 et 4), sont présents dans les vacuoles fongiques du manteau interne.

Le réseau de Hartig, continu et unisérié (Planche XIV, Fig. 5), se compose d'hyphes généralement de petite taille et dont les vacuoles renferment des globules (Planche XIV, Fig. 5) et des granules denses (Planche XIV, Fig. 6).

Dans le cortex profond dépourvu de réseau de Hartig, (Planche XIV, Fig. 7), des hyphes intracellulaires peuvent être observées. Les cellules de l'endoderme renferment des polyphénols vacuolaires. Le cylindre central, (Planche XIV, Fig. 8), ne présente pas de formations secondaires. Il ne contient également aucune hyphe.

C. LES RACINES PORTEUSES DE MYCORHIZES DE *FAGUS SYLVATICA*

L'ultrastructure de ces racines porteuses de mycorhizes est la même que celle observée chez les racines porteuses prélevées dans la rendzine, en été. Le cortex est dégénérescent et les cellules contiennent des hyphes (Planche XV, Fig. 1). Les parois internes des cellules végétales sont caractérisées par un épaississement pariétal très important (Planche XV, Fig. 1). D'autre part, la couche pariétale interne des cellules endodermiques et subéreuses sous-jacentes, présente un liseré sombre comparable à celui signalé précédemment (Planche XV, Fig. 2).

Le cylindre central, (Planche XV, Fig. 3 et 4), montre des formations secondaires (phellogène, suber, cambium, phloème et xylème secondaires).

IV. ETUDE CYTOCHIMIQUE

A. LES MYCORHIZES DE *CENOCOCCUM GEOPHILUM*

Les résultats sont rassemblés dans le tableau 11 et sont illustrés dans les planches XVI et XVII.

1. Le test PATAg

Le mucilage présent en surface réagit fortement au test PATAg (Planche XVI, Fig. 1). Les parois des hyphes de la zone externe du manteau sont très réactives (Planche XVI, Fig. 1). En revanche, le ciment interhyphal n'est pas réactif.

Dans la partie interne du manteau fongique, (Planche XVI, Fig. 2), la paroi des hyphes réagit fortement alors que le ciment montre une réponse négative. Le glycogène cytoplasmique est très réactif et présente un aspect similaire à celui des vésicules claires observées lors de l'étude ultrastructurale.

Dans la zone d'échange entre les deux partenaires, (Planche XVI, Fig. 3), les parois des hyphes intracellulaires ainsi que celles des cellules racinaires, (Planche XVI, Fig. 3), réagissent également très fortement au test PATAg. Le glycogène présent dans le cytoplasme des hyphes est fortement marqué. Il semble localisé dans des zones plus claires. Un témoin du test PATAg, (Planche XVI, Fig. 4), confirme la nature polysaccharidique des parois cellulaires et du glycogène puisque aucun marquage n'est observé.

Dans le cortex, (Planche XVI, Fig. 5), les jonctions cellulaires et les parois des cellules corticales montrent une réponse relativement forte. Le témoin du test PATAg, dans cette zone, (Planche XVI, Fig. 6), ne montre aucun marquage au niveau des parois des cellules corticales. Les parois des cellules endodermiques, (Planche XVI, Fig. 7), ne sont pas marquées.

Dans le cylindre central, les parois des cellules du péricycle et celles des vaisseaux (Planche XVI, Fig. 8), réagissent négativement au test PATAg. En revanche, les parois des cellules du parenchyme et les jonctions cellulaires sont plus réactives. Le liseré pariétal qui borde la cavité des vaisseaux apparaît dense.

2. Le marquage de Gomori-Swift

Le mucilage de surface, (Planche XVII, Fig. 1), réagit par endroit très fortement au réactif de Swift. Les parois des hyphes constituant la partie externe du manteau fongique sont marquées alors que le ciment interhyphal réagit négativement (Planche XVII, Fig. 2).

Les parois des hyphes formant le manteau plus interne ainsi que le ciment interhyphal sont également bien marqués (Planche XVII, Fig. 2).

Au niveau de la zone d'échange entre les cellules corticales et les hyphes intracellulaires, (Planche XVII, Fig. 3), les hyphes ont une paroi peu marquée alors que leur cytoplasme est très réactif. Le marquage au niveau des parois végétales est similaire à celui observé au niveau des parois des hyphes (Planche XVII, Fig. 3).

Les parois des cellules endodermiques ne réagissent pas au réactif de Swift, celles des cellules corticales ainsi que les jonctions cellulaires réagissent faiblement alors que leur cytoplasme montre un marquage intense (Planche XVII, Fig. 4).

Dans le cylindre central, les parois des cellules du péricycle, des vaisseaux xylémiens ainsi que les jonctions cellulaires répondent négativement au réactif de Swift. En revanche,

	CONSTITUANTS	NATURE CHIMIQUE	
		SOL PODZOLIQUE	
		Polysaccharides	Protéines
Manteau externe	Parois fongiques	+++	+++
	Ciment	+++	-
Manteau interne	Parois fongiques	++	-
	Ciment	+	-
	Glycogène	+++	-
Réseau de Hartig	Parois fongiques	++	-
	Parois des cellules corticales voisines	++	+(+)
	Ciment	++	+++
	Glycogène	+++	-
Cortex	Parois des cellules corticales	++	+
	Jonctions cellulaires	++	++
	Parois des cellules endodermiques	-	++
Cylindre central	Parois des cellules du péricycle	+	++
	Parois des cellules du parenchyme	++	++
	Jonctions cellulaires	++	++
	Parois lignifiées des vaisseaux	-	++
	Liseré interne des parois du xylème	++	++

Tableau 12 : Organisation et nature glycoprotéique des constituants formant les structures présentes dans les mycorhizes de *Fagus sylvatica* / *Lactarius subdulcis* prélevées en été, dans le sol podzolique.

les parois des cellules du parenchyme réagissent faiblement. Le liseré pariétal dense bordant la cavité des vaisseaux apparaît plus dense.

B. LES MYCORHIZES DE *LACTARIUS SUBDULCIS*

Les résultats sont indiqués dans le tableau 12 et dans les planches XVIII et XIX.

1. Le test PATAg

Les parois des hyphes de l'ensemble du manteau fongique (Planche XVIII, Fig. 1 et 2) sont très réactives au test PATAg. Alors que le ciment interhyphal du manteau externe (Planche XVIII, Fig. 1) est marqué, celui du manteau interne (Planche XVIII, Fig. 2) ne l'est que très légèrement. Dans le manteau interne, les réserves de glycogène cytoplasmique montrent une forte réaction positive.

Au niveau du réseau de Hartig, (Planche XVIII, Fig. 3), les structures extracellulaires (parois des hyphes et des cellules corticales voisines, ciment interfacial) et intracellulaire (glycogène fongique) réagissent fortement au test PATAg.

Dans le cortex (Planche XVIII, Fig. 4), les parois cellulaires et les jonctions cellulaires sont bien marquées. En revanche, les parois des cellules endodermiques ne sont pas réactives.

Dans le cylindre central (Planche XVIII, Fig. 5), les parois des cellules du péricycle réagissent faiblement. En revanche, une réaction positive plus intense a été observée au niveau des parois cellulaires du parenchyme et des jonctions cellulaires. Le liseré pariétal dense qui borde la cavité des vaisseaux xylémiens est fortement marqué alors que la paroi épaissie des vaisseaux montre une réponse négative au test PATAg.

2. Le marquage de Gomori-Swift

Les parois des hyphes constituant le manteau externe (Planche XIX, Fig. 1) présentent une réaction très forte au réactif de Swift, alors que le ciment réagit peu ou pas.

Les parois des hyphes du manteau interne ainsi que le ciment ne réagissent pas (Planche XIX, Fig. 2). En revanche, leur cytoplasme est marqué de même que des globules vacuolaires de grande taille. L'Ascomycète associé à la mycorhizes à *Lactarius subdulcis* a été observé (Planche XIX, Fig. 3). Sa paroi se subdivise en une couche interne non réactive et en une couche externe, plus fine et fortement marquée. De même, les corps de Woronin présentent un certain marquage.

	CONSTITUANTS	NATURE CHIMIQUE *SOL PODZOLIQUE*	
		Polysaccharides	Protéines
Cortex	Parois des cellules corticales	-	+
	Parois des hyphes intracellulaires	+/++	+
	Jonctions cellulaires	+	+
	Parois des cellules endodermiques	-	-
Cylindre central	Parois des cellules du suber	-	-
	Parois des cellules du phellogène	-	-
	Parois des cellules du parenchyme	+	+
	Jonctions cellulaires	++	-
	Parois lignifiées des vaisseaux	-	+
	Liseré dense interne des vaisseaux	+++	+++

Tableau 13 : Organisation et nature glycoprotéique des constituants formant les structures présentes dans les racines porteuses de mycorhizes de *Fagus sylvatica* prélevées en été, dans le sol podzolique.

Dans le réseau de Hartig (Planche XIX, Fig. 4), les parois fongiques ne sont pas marquées alors que celles des cellules corticales sont réactives. Le ciment présente un marquage très intense.

Dans le cortex (Planche XIX, Fig. 5), les parois cellulaires sont très faiblement marquées. En revanche, les jonctions cellulaires sont très réactives. La lamelle moyenne présente également un marquage intense. Le cytoplasme des cellules est très réactif. L'Ascomycète présent dans le cortex, (Planche XIX, Fig. 6), ne montre aucun marquage de la couche interne de sa paroi. La limite de la couche pariétale externe qui est très réactive, ne se distingue pas du cytoplasme des cellules corticales.

Au niveau des parois cellulaires de l'endoderme et de l'ensemble du cylindre central (parois cellulaires du péricycle, du parenchyme, des vaisseaux xylémiens et jonctions cellulaires) une réaction très intense a été observée (Planche XIX, Fig. 7).

C. Les racines porteuses de mycorhizes de *Fagus sylvatica*

Le tableau 13 et la planche XX rassemblent les résultats obtenus.

1. Le test PATAg

Les parois des cellules corticales ne sont pas marquées par le test PATAg (Planche XX, Fig. 1). En revanche, les jonctions cellulaires le sont faiblement. Les parois des hyphes intracellulaires, (Planche XX, Fig. 1), peuvent être très réactives. Certaines le sont moins.

Les parois des cellules de l'endoderme, du suber et du phellogène répondent négativement (Planche XX, Fig. 2).

Dans le cylindre central, les parois des cellules du parenchyme sont faiblement marquées. En revanche, les jonctions cellulaires ainsi que le liseré pariétal bordant la cavité des vaisseaux xylémiens sont très réactifs alors que la paroi épaissie des vaisseaux montre une réaction négative (Planche XX, Fig. 3).

2. Le marquage de Gomori-Swift

Les parois des cellules du cortex, des hyphes intracellulaires et les jonctions cellulaires réagissent faiblement au réactif de Swift.

Les parois des cellules de l'endoderme, du suber et du phellogène ne sont pas marquées par ce réactif (Planche XX, Fig. 4). En revanche, la lamelle moyenne est soulignée par un discret marquage.

	CONSTITUANTS	*SOL PODZOLIQUE*		
		Calcium	Azote	Silicium
Surface de la mycorhize	Mucilage	+	+	traces
Manteau externe	Parois fongiques	traces	traces	traces
	Ciment	traces	-	traces
Manteau interne	Parois fongiques	(+)	(+)	traces
	Ciment	(+)	(+)	traces
	Plages de polyphénols striées	+	+	traces
	Plages de polyphénols non striées	+	+	traces
	Globules vacuolaires	+	++	traces*
	Granules de polyphosphates	no	no	no
Hyphes intracellulaires	Parois fongiques	traces	traces	-
	Parois des cellules corticales	traces	traces	traces
	Ciment	/	/	/
	Polyphénols vacuolaires	(+)	(+)	traces
	Globules vacuolaires	(+)	++	traces*
	Granules de polyphosphates	++**	-	-
Cortex	Parois des cellules corticales	-	traces	-
	Jonctions cellulaires	(+)	(+)	-
	Parois des cellules endodermiques	(+)	(+)	-
	Polyphénols de l'endoderme	+	++	traces
Cylindre central	Parois des cellules du péricycle	traces	traces	-
	Parois des cellules du parenchyme	traces	traces	traces
	Polyphénols du parenchyme	-	++	traces
	Jonctions cellulaires	+	+	traces
	Parois lignifiées des vaisseaux	-	-	traces
	Liseré interne des parois du xylème	+	+(+)	traces

Tableau 14 : Localisations du calcium, de l'azote et du silicium dans les structures des mycorhizes de *Fagus sylvatica* / *Cenococcum geophilum* prélevées en été, dans le sol podzolique. * : associé à des traces d'aluminium ; ** : associé au phosphore.

Dans le cylindre central (Planche XX, Fig. 5), les parois des cellules du parenchyme et des vaisseaux sont peu réactives. Le liseré pariétal bordant la cavité des vaisseaux réagit très fortement et aucun marquage n'est observé au niveau des jonctions cellulaires.

V. ETUDE MICROANALYTIQUE

A. LES MYCORHIZES DE *CENOCOCCUM GEOPHILUM*

Les résultats sont présentés dans le tableau 14.

1. La surface des mycorhizes

Le mucilage, de nature polysaccharidique, qui recouvre toute la surface de la mycorhize est épais et accumule du calcium et de l'azote. Des traces de silicium ont été détectées à ce niveau.

2. Le manteau

Les hyphes du manteau superficiel présentent des traces de calcium, d'azote et de silicium dans leur paroi. Le ciment peut renfermer des traces de calcium et de silicium mais pas d'azote.

Dans la partie interne du manteau, le calcium et l'azote sont principalement détectés dans les plages de composés polyphénoliques striées ou non. Les vacuoles des hyphes renferment de volumineux globules à contours flous qui sont riches en azote et contiennent du calcium et des traces de silicium et d'aluminium. Le ciment interhyphal ainsi que les parois fongiques accumulent peu le calcium et l'azote. Le silicium est présent à l'état de traces au niveau des parois fongiques, du ciment, des plages polyphénoliques (striées ou non) et des globules vacuolaires riches en azote.

3. Les hyphes intracellulaires

Les parois des hyphes intracellulaires ainsi que les parois des cellules corticales qui les contiennent, n'accumulent que des traces de calcium et d'azote. Les parois des cellules corticales contiennent également des traces de silicium. Les globules volumineux observés dans la vacuole de certaines de ces hyphes renferment de l'azote associé à un peu de calcium, de silicium et d'aluminium. Des granules de polyphosphates riches en calcium peuvent être présents.

	CONSTITUANTS	*SOL PODZOLIQUE*		
		Calcium	Azote	Silicium
Surface de la mycorhize		-	-	-
Manteau externe	Parois fongiques	traces	++	traces
	Ciment	-	+(+)	traces
Manteau interne	Parois fongiques	traces	++	traces
	Ciment	traces	++	traces *
	Plages de polyphénols striées	++	++	-
	Plages de polyphénols non striées	++++	++++	traces
	Globules vacuolaires	+	+++	traces *
	Granules de polyphosphates	++ **	-	-
Réseau de Hartig	Parois fongiques	++	++	traces
	Parois des cellules corticales	+++	++++	- *
	Ciment	+++	+++	traces
	Polyphénols vacuolaires	++	++	traces
	Granules de polyphosphates	no	no	no
	Globules vacuolaires	traces	++	traces *
Cortex	Parois des cellules corticales	-	+(+)	traces *
	Jonctions cellulaires	-	(+)	traces *
	Parois des cellules endodermiques	-	-	traces
	Polyphénols de l'endoderme	+	+	traces
Cylindre central	Parois des cellules du péricycle	traces	(+)	traces
	Parois des cellules du parenchyme	-	+(+)	traces
	Polyphénols du parenchyme	-	(+)	-
	Jonctions cellulaires	-	+(+)	traces
	Parois lignifiées des vaisseaux	-	(+)	traces
	Liseré dense interne des vaisseaux	-	(+)	-

Tableau 15 : Localisations du calcium, de l'azote et du silicium dans les structures des mycorhizes de *Fagus sylvatica* / *Lactarius subdulcis* prélevées en été, dans le sol podzolique. * : associé à des traces d'aluminium ; ** : associé au phosphore.

Les composés polyphénoliques présents dans les vacuoles des cellules corticales renferment des traces de silicium ainsi que de faibles proportions de calcium et d'azote.

4. Le cortex profond

En juillet, dans les mycorhizes prélevées dans le sol podzolique, le calcium et l'azote sont détectés dans les jonctions cellulaires du cortex et dans l'endoderme (parois épaissies et composés polyphénoliques vacuolaires où ils sont majoritairement présents). Ces deux éléments ne semblent pas être accumulés dans les autres structures du cortex, car seules des traces d'azote ont été détectées dans les parois des cellules corticales. Le silicium est uniquement présent dans les composés polyphénoliques vacuolaires de l'endoderme.

5. Le cylindre central

Dans le cylindre central, le calcium et l'azote sont détectés à l'état de traces dans les parois des cellules du péricycle et du parenchyme. Ils sont également présents dans les jonctions cellulaires. De l'azote est plus abondamment détecté dans les polyphénols contenus dans les cellules du parenchyme. Alors que la paroi secondaire des vaisseaux xylémiens ne contient pas de calcium et d'azote, ces deux éléments ont été détectés dans le liseré pariétal interne bordant la cavité des vaisseaux. La présence de silicium a été observée à l'état de traces dans les jonctions, dans les parois des cellules parenchymateuses et dans les polyphénols qu'elles contiennent ainsi que dans la paroi secondaire des vaisseaux xylémiens et le liseré pariétal dense bordant leur cavité.

B. Les mycorhizes de *Lactarius subdulcis*

Le tableau 15 indique les résultats des différentes analyses réalisées.

1. La surface des mycorhizes

La surface des mycorhizes ne semble pas avoir la capacité de fixer les éléments recherchés.

2. Le manteau

Le calcium n'est détecté qu'à l'état de traces dans les parois fongiques de l'ensemble du manteau et dans le ciment du manteau interne. Par contre, il est très abondant dans les plages de composés polyphénoliques incorporées au manteau, qu'elles soient striées ou non. Le

calcium peut être présent en faible proportion dans les globules vacuolaires fongiques en association avec l'azote. Les granules de polyphosphates de calcium sont observés dans les vacuoles des hyphes du manteau interne. Ils sont, toutefois, moins nombreux que les globules précédents. Le silicium a été détecté à l'état de traces dans les parois et les ciments des manteaux externe et interne, dans les plages polyphénoliques non striées et parfois dans les globules vacuolaires fongiques riches en azote. Des traces d'aluminium ont été détectées dans le ciment du manteau interne et dans les globules azotés. L'azote est très abondant dans toutes les structures du manteau (parois fongiques, ciments, polyphénols et globules vacuolaires).

3. Le réseau de Hartig

Dans le réseau de Hartig bien développé, le calcium et l'azote sont très abondamment détectés dans les parois fongiques et végétales, dans le ciment et dans les polyphénols striés contenus dans les vacuoles des cellules corticales voisines du réseau de Hartig (les polyphénols non striés n'ont pas été observés).

Des traces de silicium ont été détectées dans les parois fongiques, le ciment et les globules vacuolaires fongiques riches en azote ainsi que dans les polyphénols contenus dans les vacuoles des cellules corticales. La présence d'aluminium a également été révélée dans les parois des cellules végétales et dans les globules fongiques vacuolaires.

4. Le cortex profond

Dans les ectomycorhizes à lactaire, seul l'azote est détecté dans les jonctions cellulaires ainsi que dans les parois des cellules du cortex. Le calcium ne s'y accumule pas. Les parois des cellules endodermiques ne renferment ni calcium, ni azote. En revanche, les composés polyphénoliques contenus dans ces cellules les accumulent plus faiblement.

Le silicium est présent au niveau des parois corticales et endodermiques, dans les jonctions cellulaires et les polyphénols accumulés dans les cellules de l'endoderme. De l'aluminium est localisé dans les parois végétales et les jonctions cellulaires.

5. Le cylindre central

Le calcium n'est pas détecté dans les parois des cellules du parenchyme et des vaisseaux du cylindre central ni dans les jonctions intercellulaires. Il est présent à l'état de traces uniquement dans la paroi des cellules du péricycle. En revanche, l'azote est localisé en faible proportion dans la paroi des cellules du péricycle, dans celle des cellules parenchymateuses, dans les jonctions ainsi que dans les polyphénols contenus dans les

	CONSTITUANTS	*SOL PODZOLIQUE*		
		Calcium	Azote	Silicium
Cortex	Parois des cellules corticales	-	traces	-
	Parois des hyphes intracellulaires	-	traces	-
	Jonctions cellulaires	(+)	(+)	-
	Parois des cellules endodermiques	-	(+)	traces
	Liseré interne pariétal / endoderme	-	-	silice
	Polyphénols de l'endoderme	traces	+	traces
Cylindre central	Parois des cellules du suber	-	-	-
	Liseré interne pariétal / suber	-	-	silice
	Parois des cellules du phellogène	traces	traces	traces
	Parois des cellules du parenchyme	-	traces	-
	Polyphénols du parenchyme	+(+)	+(+)	-
	Jonctions cellulaires	+	(+)	-
	Parois lignifiées des vaisseaux	-	-	-
	Liseré dense interne des vaisseaux	-	traces	-

Tableau 16 : Localisations du calcium, de l'azote et du silicium dans les structures des racines porteuses de mycorhizes de *Fagus sylvatica* prélevées en été, dans le sol podzolique.

cellules parenchymateuses. Il a été détecté dans les parois lignifiées des vaisseaux et au niveau du liseré dense bordant leur cavité.

Le silicium n'est détecté qu'à l'état de traces dans les parois des cellules du péricycle, des cellules parenchymateuses et des vaisseaux ainsi que dans les jonctions cellulaires. Par contre, il est absent du liseré dense bordant la cavité des vaisseaux et des polyphénols vacuolaires présents dans les cellules parenchymateuses. L'aluminium ne s'accumule pas dans le cylindre central.

C. LES RACINES PORTEUSES DE MYCORHIZES DE *FAGUS SYLVATICA*

Les résultats des différentes analyses sont rassemblés dans le tableau 16.

1. Le cortex

Dans le cortex, le calcium est faiblement détecté dans les jonctions cellulaires. Il semble être absent des parois des cellules corticales et endodermiques ainsi que dans les parois des hyphes intracellulaires. L'azote est présent dans les parois des cellules corticales et endodermiques, dans les parois des hyphes intracellulaires ainsi que dans les jonctions cellulaires. Cependant, les polyphénols vacuolaires contenus dans les cellules endodermiques renferment du calcium et de l'azote en très faible proportion.

Le silicium semble absent du cortex exception faite de la paroi épaissie des cellules endodermiques et des polyphénols qu'elles contiennent. En revanche, les analyses EELS montrent qu'il est présent dans l'endoderme sous la forme d'une bande fine de silice localisée contre la paroi interne de ses cellules.

2. Le cylindre central

Les parois des cellules du suber n'accumulent pas les éléments recherchés. Cependant, le silicium est présent sous la forme d'une bande de silice située contre la paroi interne des cellules subéreuses produites par le phellogène.

Au niveau du cylindre central, le calcium et l'azote sont principalement présents dans les polyphénols des cellules du parenchyme et dans les jonctions cellulaires. Des traces d'azote ont été détectées dans les parois des cellules du parenchyme ainsi que dans le liseré dense bordant la cavité des vaisseaux. Les parois des cellules du péricycle ou du phellogène contiennent des traces de calcium, d'azote et de silicium.

DISCUSSION :

Cette seconde partie de notre travail a consisté à étudier, sur un second sol, les deux mycorhizes caractérisées dans le chapitre I. La comparaison entre les résultats obtenus sur les deux sites doit permette de mettre en évidence un effet du sol sur les partenaires de la symbiose mycorhizienne et d'analyser l'impact de l'acidité (pH de l'ordre de 4) et de la pauvreté en éléments minéraux (sol podzolique) sur la mycorhization et le comportement des systèmes racinaires.

I. EFFET DU SOL SUR LA COLONISATION PAR LES CHAMPIGNONS MYCORHIZIENS DU SYSTEME RACINAIRE DU HETRE

Il a été défini précédemment que les conditions pédologiques des deux stations sont très différentes, particulièrement en ce qui concerne la teneur en ions calcium disponibles dans le sol et le pH acide ou basique qui en découle. Ces deux facteurs peuvent induire des modifications du cortège mycorhizien associé à l'arbre (Robson et Abbott, 1989) mais également des variations morphologiques d'un même type mycorhizien.

Les résultats présentés indiquent que le type de sol ne semble pas avoir une influence majeure sur le taux de mycorhization du Hêtre puisqu'il présente une proportion de mycorhizes très élevée (proche de 100%) (Sougney-Rémy *et al.*, 1993). Les mycorhizes de *Cenococcum geophilum* et de *Lactarius subdulcis* ont été observées dans les deux sols concernés et sont principalement localisées dans la litière et dans l'horizon organo-minéral A1, où se concentrent généralement les racines courtes (Mikola, 1973 ; Vogt *et al.*, 1980 ; Rose et Paranka, 1987) et les mycorhizes (Moyersoen *et al.*, 1998).

Il semble donc que ces deux champignons soient capables de se développer dans des sols très différents. Toutefois, une différence majeure a été notée concernant l'abondance des deux mycorhizes. En effet, les mycorhizes noires de *Cenococcum geophilum* sont de petite taille et abondantes dans le sol calcaire mais de taille plus importante et rares dans le sol acide. A l'inverse, les mycorhizes jaune orangé de *Lactarius subdulcis* sont plus abondantes dans ce dernier sol et conservent une taille relativement importante dans les deux sites. La faible colonisation des racines courtes du Hêtre par *Cenococcum geophilum* sur sol acide, se rapproche des observations de Metzler et Oberwinkler (1987) sur le système racinaire de Pins à des pH allant de 3 à 6. Bakker (1998) a également observé à la suite d'un amendement calcaire, une stimulation du développement des mycorhizes présentant un mycélium extramatriciel abondant et une répression de la formation des mycorhizes lisses. Dans notre cas, deux explications

peuvent être avancées : il peut s'agir de l'effet d'une différence de compétitivité entre les divers organismes du sol (comme cela a été évoqué dans la discussion du chapitre I) et/ou d'un effet du pH du sol. Il est maintenant connu que le pH optimum de croissance de la plupart des champignons se situe vers 5,5 c'est-à-dire un pH légèrement acide (Slankis, 1974 ; Hung et Trappe, 1983). Ainsi, les conditions de pH du sol calcaire (pH de l'ordre de 7,5 à 8) sont peu favorables pour le développement d'un grand nombre de champignons dont *Lactarius subdulcis*. En revanche, *Cenococcum geophilum* est un champignon ubiquiste, peu compétitif, susceptible de se développer dans des substrats présentant des conditions, notamment de pH, très éloignées (Trappe, 1962 ; El Fares, 1974). Ainsi, la compétition interspécifique étant réduite dans le sol calcaire, *Cenococcum geophilum* peut croître de manière prépondérante. A l'inverse, dans le sol acide, bien que le pH du sol soit très bas, la croissance de la majorité des organismes fongiques du sol n'est plus autant limitée. Dans ce cas, la compétition, pour l'espace comme pour les nutriments, entre les différentes espèces se fait au détriment de *Cenococcum*. L'exclusion de ce champignon du système racinaire du Hêtre ne serait alors pas inconcevable. Cependant, outre une gamme très large de pH et de températures permettant son développement, *Cenococcum geophilum* produit un abondant mycélium extramatriciel qui lui permet de puiser des nutriments dans un volume plus important de sol. Nos observations ont par ailleurs montré que ce mycélium extramatriciel est plus abondant dans le sol acide que dans le sol calcaire. Il compense donc partiellement la faible compétitivité de *Cenococcum geophilum*, dont la croissance est alors restreinte mais pas totalement inhibée.

Le faible développement de *Cenococcum geophilum* dans ce sol acide profite aux autres associations mycorhiziennes notamment à *Lactarius subdulcis* dont les mycorhizes constituent le type mycorhizien dominant. L'importance du développement de *Lactarius subdulcis* dans le sol podzolique, outre des conditions environnementales plus favorables, pourrait s'expliquer par une plus grande compétitivité vis-à-vis des autres organismes notamment par le biais de substances fongistatiques (Boullard, 1990). Les espèces de lactaires sont notamment connues pour produire de manière plus ou moins importante des composés toxiques dont la plupart appartiennent aux terpénoïdes et qui ont pour fonction de protéger le lactaire des parasites ou des infections (Sterner *et al.*, 1985). Les lactaires ne sont pas les seuls à mettre en place ce type de système de défense. D'autres champignons ectomycorhiziens sont en effet capables de produire des composés antibiotiques, protégeant ainsi la racine de l'attaque de pathogènes. C'est ainsi que Duchesne *et al.* (1987 ; 1988a et b) ont observé que l'inoculation de plantules de *Pinus resinosa* avec le champignon *Paxillus involutus* réduit significativement la sporulation du champignon pathogène *Fusarium oxysporum*.

La présence de sclérotes produits par *Cenococcum geophilum* dans le sol podzolique, confirme les difficultés de développement de ce champignon et/ou sa faible compétitivité. En effet, les sclérotes sont des formes de résistance fongiques formées par certains champignons en réponse à des conditions difficiles. Ils sont compacts et durs du fait de la pression de la masse de cellules les unes sur les autres (Trappe, 1962). Cette dureté est sans doute due également à la présence de mélanines en surface (Metzler et Oberwinkler, 1987). Les mélanines des parois hyphales sont connues pour isoler les cellules fongiques du milieu externe et pour leur conférer une résistance aux chitinases, aux β-glucanases, aux UV, et aux rayons X (Paris *et al.*, 1993). Cette gaine qui enrobe les couches les plus superficielles d'hyphes pourrait s'apparenter au mucilage présent en surface des mycorhizes de *Cenococcum geophilum* qui assurerait ainsi une protection particulièrement efficace.

Ainsi, *Cenococcum geophilum* se comporte de façon très différente à la Crédence (sol calcaire et basique) où il ne forme pas de sclérotes mais établit un grand nombre de mycorhizes et à Bezange (sol acide pauvre en éléments minéraux) où il produit des sclérotes et peu de mycorhizes. *Lactarius subdulcis* présente un comportement inverse à celui de *Cenococcum geophilum* en fonction du type de sol puisqu'il domine dans le sol acide. En revanche, il ne produit pas de formes de résistance.

Il semble donc que les conditions du sol soient déterminantes dans le développement mycorhizien puisque la présence de calcaire a notamment été mise en cause dans le cas de *Cenococcum geophilum* (El Fares, 1974). Néanmoins, d'autres facteurs édaphiques peuvent intervenir sur la colonisation des systèmes racinaires par les champignons (Moyersoen *et al.*, 1998). C'est le cas de la température (Parke *et al.*, 1983 ; Samson et Fortin, 1986 ; Udaiyan *et al.*, 1996 ; Sayed *et al.*, 1997) et du pH du sol (Shafer *et al.*, 1985 ; Stroo *et al.*, 1988 ; Medeiros *et al.*, 1994 ; Lehto, 1994 ; Rudawska *et al.*, 1996 ; Kieliszewska-Rokicka *et al.*, 1998), de l'humidité dans le sol (Bougher et Malajczuk, 1990 ; Udaiyan *et al.*, 1996 ; Weyman-Kaczmarkowa et Pedziwilk, 1997 ; Sayed *et al.*, 1997) et de son aération (Callot et Jaillard, 1996 ; Weyman-Kaczmarkowa et Pedziwilk, 1997).

II. EFFET DU SOL SUR L'ORGANISATION MYCORHIZIENNE

Si les effets de différents facteurs du sol sur le développement mycorhizien ont été largement étudiés, particulièrement chez les champignons endomycorhiziens et dans une moindre mesure chez les champignons ectomycorhiziens, très peu de travaux, à notre

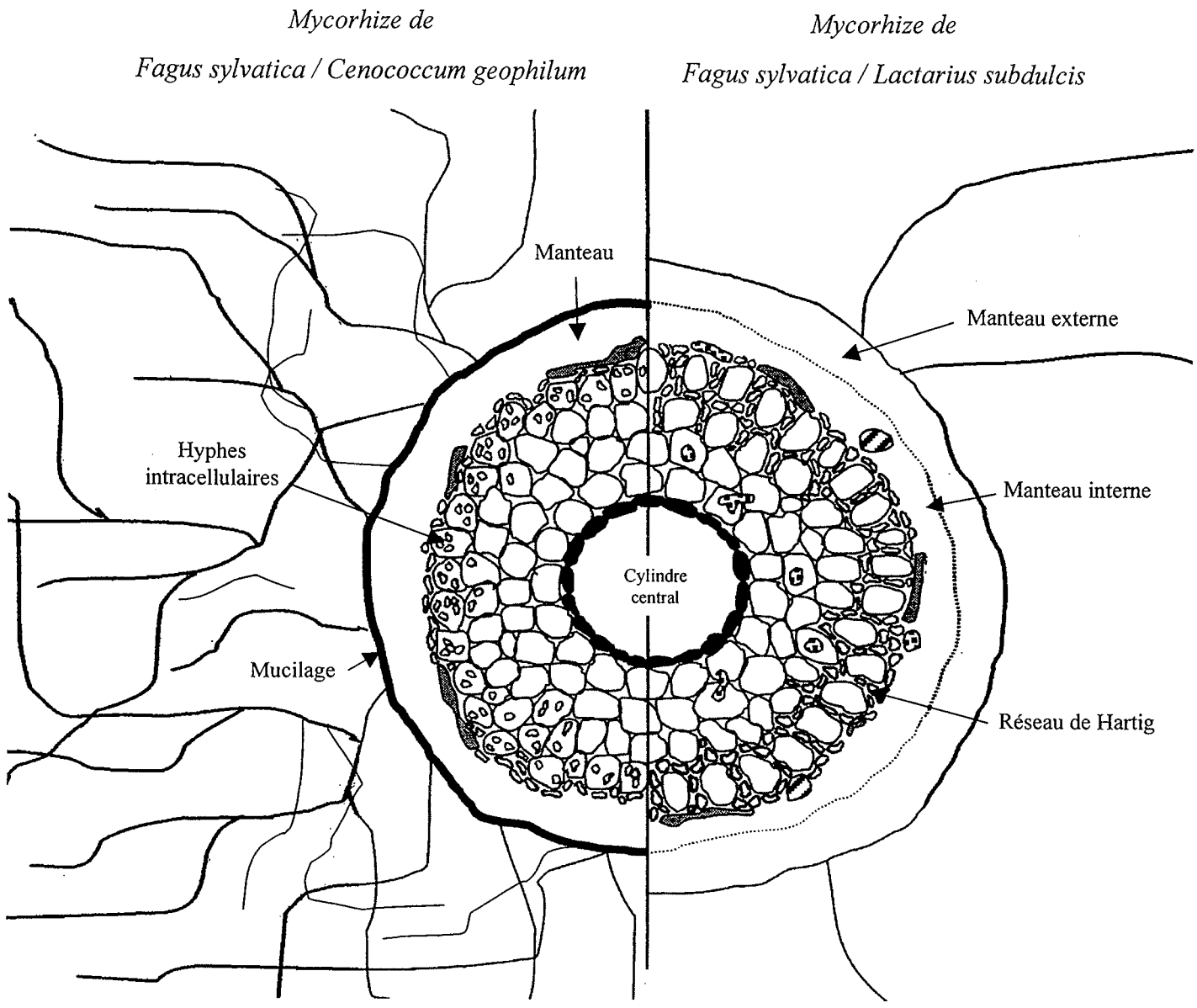


Figure 24 : Représentation schématique de l'organisation des deux mycorhizes récoltées dans le sol podzolique, pendant l'été. : Ascomycète associé ; : laticifère ; : composés polyphénoliques.

connaissance, ont été réalisés sur les modifications ultrastructurales des mycorhizes en conditions naturelles.

Les mycorhizes de *Lactarius subdulcis* présentent, dans le sol acide, une ultrastructure similaire à celle observée chez les mycorhizes récoltées dans le sol calcaire. Il s'agit d'une organisation ectomycorhizienne (figure 24) avec un manteau épais et un réseau de Hartig continu et unisérié. Prévost et Pargney (1995) ont également décrit cette structure pour les mycorhizes formées par ce champignon dans un sol brun acide dont le pH est voisin de 5. Il semble donc que *Lactarius subdulcis* soit capable de supporter des conditions variées de pH. Toutefois, les pH acides lui conviennent mieux, ce qui est confirmé dans notre cas puisque ces mycorhizes sont rares dans le sol basique. Le type de sol ne semble donc pas avoir une influence majeure sur la structure des ectomycorhizes formées par *Lactarius subdulcis*.

En revanche, les mycorhizes de *Cenococcum geophilum* (figure 24) montrent une différence ultrastructurale considérable puisque le réseau de Hartig observé chez les mycorhizes sur sol calcaire, est absent dans celles du sol podzolique. Dans ce dernier cas, sous le manteau fongique, les cellules corticales superficielles renferment des hyphes. Les coupes fines réalisées ne passant pas par les interruptions septales des articles mycéliens, il est alors très difficile d'identifier le champignon intracellulaire. Toutefois, quelques arguments sont en faveur d'un Ascomycète. En effet, lorsque plusieurs hyphes sont contenues dans la même cellule corticale, elles sont liées par un ciment interhyphal relativement sombre et non clair comme ce serait le cas avec un Basidiomycète. De plus, un comportement saprophyte de *Cenococcum geophilum* a déjà été décrit par Paris *et al.* (1993). Il est donc fort probable que les champignons formant le manteau et les hyphes intracellulaires correspondent à un seul partenaire fongique. Une étude ancienne (Mikola, 1948) a interprété certaines formes intracellulaires de *Cenococcum geophilum* comme du parasitisme. Cependant, dans notre cas, les hyphes observées sont localisées dans les cellules corticales vivantes renfermant notamment des mitochondries qui témoignent du fonctionnement physiologique des cellules. Il n'est donc pas ici question de parasitisme. Ce changement de comportement d'un même champignon a été observé chez un autre champignon, *Armillariella mellea*, qui se comporte comme un pathogène sur les conifères mais établit une association symbiotique avec l'orchidée *Gastrodia* (Kusano, 1911). De même, une même espèce fongique peut former des mycorhizes monotropoïdes avec *Monotropa* et des ectomycorhizes typiques avec des arbres tels que *Picea* ou *Fagus* (Smith et Read, 1997). Cependant, dans ces exemples, l'associé végétal est différent, ce qui semble indiquer une influence importante de la plante hôte. Parmi les études concernant un même couple champignon-plante hôte, Fortas et Chevalier (1988) accordent une grande importance à la nature du substrat sur le déterminisme de la morphologie et la structure des mycorhizes. Ces auteurs ont ainsi montré que trois espèces de

Terfez (*Terfezia arenaria*, *T. claveryi* et *Tirmania pinoyi*) établissent des mycorhizes différentes avec leur hôte naturel le plus commun, *Helianthemum guttatum*, en fonction du type de substrat. Ils ont relié plus particulièrement ces observations à la richesse des milieux de culture en phosphore. En effet, ces trois Terfez forment des ectomycorhizes dans le substrat riche en phosphore et des endomycorhizes dans le substrat carencé en phosphore. Les analyses des phosphates que nous avons effectuées dans les deux sols ont révélé que le phosphore total est plus abondant dans la rendzine brunifiée que dans le sol podzolique, ce qui irait dans le sens de ces observations. Cependant, les phosphates soluble et échangeable sont en plus forte proportion dans le sol acide. Dans le sol calcaire, le phosphate est donc sous une forme complexée peu soluble. Cet élément pourrait donc ne pas être le facteur induisant les modifications ultrastructurales observées chez les mycorhizes de *Cenococcum geophilum*. Toutefois, il ne faut pas oublier que, contrairement à celle du sol acide, la microflore du sol calcaire est très abondante et qu'elle comprend notamment de nombreux champignons de pourriture blanche, lesquels possèdent une capacité de décomposition élevée des molécules organiques complexes. Ces organismes peuvent donc solubiliser le phosphate et le rendre accessible. L'hypothèse émise ne peut donc pas être totalement exclue.

Kieliszewska-Rokicka *et al.* (1998) ont également observé des modifications structurales (absence de réseau de Hartig) des mycorhizes de plants de *Pinus* inoculés par *Suillus* en fonction du substrat. Dans cette étude, l'élément impliqué est l'aluminium qui est apporté avec une solution d'arrosage de $Al_2(SO_4)_3$ pour une concentration en ions aluminium de 4 mM.

Dans notre cas, il nous est également difficile d'impliquer uniquement l'aluminium ou le phosphore dans la variation structurale observée puisque nous n'avons pas travaillé en conditions contrôlées et que par conséquent un grand nombre de facteurs peuvent intervenir conjointement.

Ainsi, nos travaux semblent indiquer que le type de sol peut perturber l'organisation structurale des mycorhizes de *Cenococcum geophilum* : les organes symbiotiques différenciés sur le sol calcaire sont de type ectomycorhize, alors que sur le sol acide, ils s'apparentent à des pseudomycorhizes ou à des ectendomycorhizes. La présence d'un véritable manteau fongique, non élaboré chez les pseudomycorhizes, suggère plutôt une structure ectendomycorhizienne.

Les conditions édaphiques, en favorisant ou en limitant le développement des différents organismes du sol, induisent une compétition interspécifique plus ou moins forte qui pourrait également expliquer en partie l'origine de cette variation structurale observée chez les mycorhizes de *Cenococcum geophilum*.

Dans les deux sites d'étude, pendant l'été 1996, les conditions climatiques (température, humidité du sol ; se référer à la figure 11 du *Matériels et Méthodes*) pouvaient être considérées

comme non limitantes, à la fois pour le développement de la plante et pour celui de ses associés fongiques. En effet, le jour de la récolte, les températures maximales étaient voisines de 20 °C et ne descendaient pas en dessous de 10 °C en moyenne et les prélèvements ont été réalisés à la suite d'une période pluvieuse. Ces conditions étaient donc relativement favorables à une bonne activité des organismes du sol. En effet, les températures trop basses ou trop élevées limitent la croissance de nombreux champignons, probablement du fait d'un changement de la composition et/ou de la quantité des exsudats racinaires par rapport à la température à laquelle pousse la plante (Theodorou et Bowen, 1971). De même une humidité insuffisante ou trop importante porte préjudice au développement fongique (Theodorou, 1978 ; Bougher et Malajczuk, 1990). Dans le sol podzolique, les conditions de pH sont moins limitantes pour le développement fongique que dans le sol basique et la compétition trophique et spatiale entre les organismes du sol est donc très importante. *Cenococcum geophilum* mettrait alors à profit sa capacité de saprophyte qui lui permet d'avoir accès à des composés carbonés directement à partir du milieu intracellulaire des cellules végétales. Cela pallierait en partie sa faible compétitivité, lui permettant de croître et de puiser dans le sol, par le mycélium extramatriciel qu'il développe, les éléments minéraux dont il a besoin. En revanche, dans le sol calcaire, comme cela a été dit précédemment, le pH élevé (pH de 7,5) est peu favorable à la croissance de nombreux champignons. La pression de sélection s'en trouve considérablement réduite et le stock de substances carbonées et azotées mis à la disposition de *Cenococcum geophilum* augmente.

Ce champignon peut alors établir des ectomycorhizes en grand nombre. La taille réduite des mycorhizes de *Cenococcum geophilum* dans ce sol pourrait s'expliquer soit par un développement limité des racines courtes du Hêtre du fait des conditions du sol (pH, ...), conduisant à l'élaboration de petites mycorhizes, soit par le fait que le champignon utilise préférentiellement les squelettes carbonés pour la formation de nouveaux organes privilégiant ainsi le nombre par rapport à la taille.

III. ABSORPTION ET STOCKAGE DES CATIONS

A. DANS LES MYCORHIZES

Les mycorhizes formées par *Cenococcum geophilum* et par *Lactarius subdulcis* présentent donc une structure différente en fonction du sol dans lequel elles se développent. Il est alors possible d'envisager également une variation dans leur comportement vis-à-vis des éléments minéraux du sol.

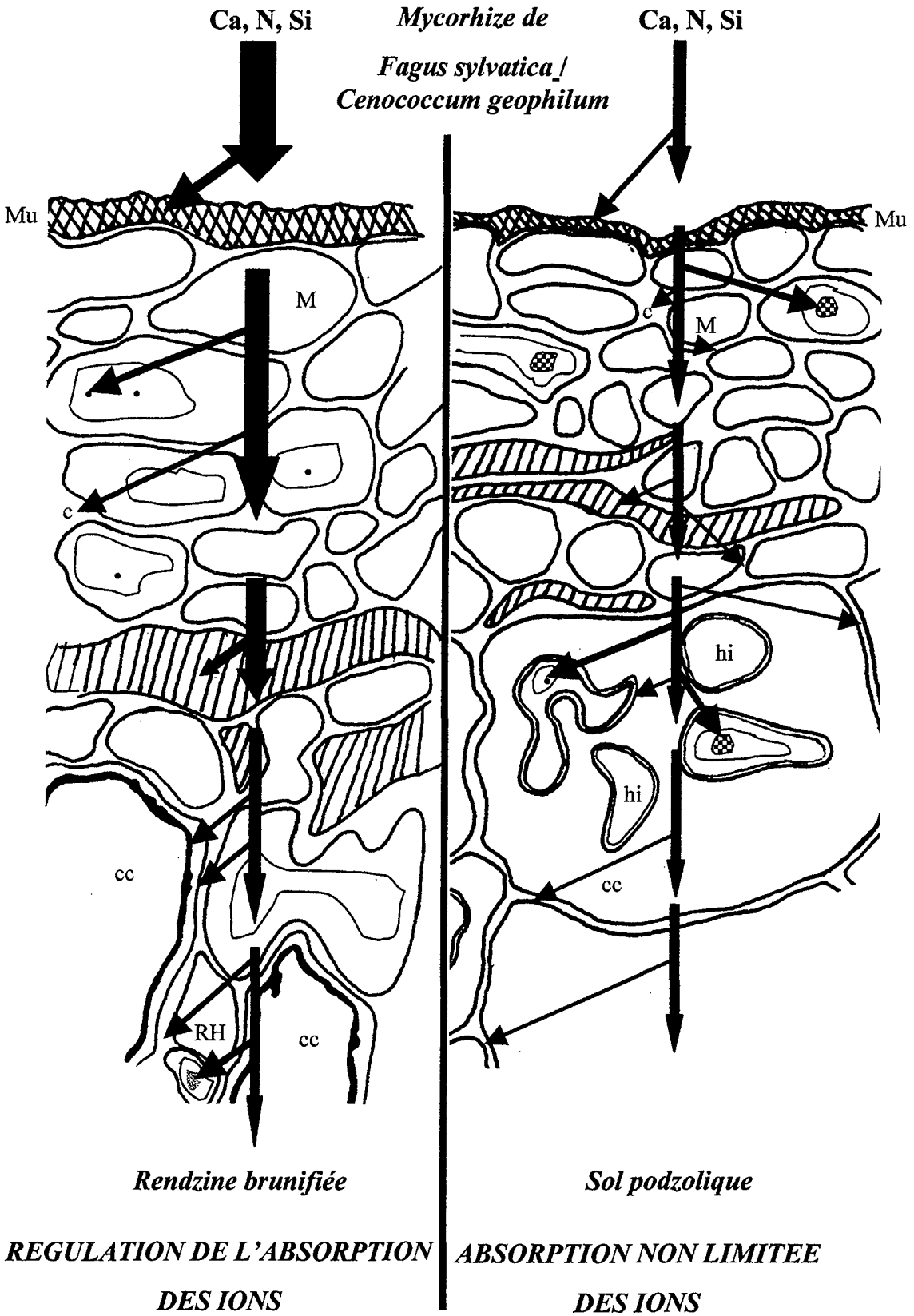


Figure 25 : Sites d'accumulation des éléments minéraux dans les différentes structures des mycorhizes de *Cenococcum geophilum* sur sol calcaire et sur sol acide. Mu : mucilage ; M : manteau fongique ; c : ciment ; RH : réseau de Hartig ; hi : hyphe intracellulaire ; cc : cellule corticale ; Al : aluminium ; ▨ : composés polyphénoliques ; ◉ : globule azoté contenant de l 'aluminium ; ● : globule azoté ; • : granule de polyphosphates.

Un comportement opposé des champignons a été remarqué selon que les mycorhizes sont issues du sol acide ou du sol calcaire.

C'est ainsi que les mycorhizes de *Cenococcum geophilum* (figure 25) accumulent moins le calcium dans le sol acide par rapport au sol basique du fait de la plus faible quantité d'ions calcium présents dans le sol. L'azote et le phosphore sont en revanche absorbés par ce champignon dans des proportions relativement similaires entre les deux sols. Dans le sol pauvre en éléments minéraux, l'ensemble des structures fongiques participe à l'accumulation des ions mais en faible proportion. A l'inverse, dans les échantillons provenant de la rendzine, certaines structures sont particulièrement aptes à stocker les ions (mucilage, composés polyphénoliques, granules de polyphosphates et globules azotés), alors que d'autres ne les fixent pas. Les différentes structures, en immobilisant les éléments, régulent ainsi leur transport vers la racine.

Dans le cas des mycorhizes de *Lactarius subdulcis* (figure 26), un comportement tout à fait différent est observé. En effet, d'une part, dans les deux sols, l'ensemble des structures mycorhiziennes stockent les éléments et d'autre part, ce champignon accumule plus les cations dans le sol acide que dans le sol calcaire. Ces résultats sont assez surprenants si l'on considère que la disponibilité des éléments est faible lorsque le pH est très acide. Plusieurs hypothèses peuvent être émises pour expliquer ce fait : i) l'âge des mycorhizes et ii) une absorption différente des cations selon leur disponibilité dans le sol.

Concernant l'âge des mycorhizes analysées, diverses études ont montré que les tissus d'organes âgés renferment plus de calcium que les tissus plus jeunes des mêmes organes (Pargney et Kottke, 1994 ; Genet, 1994 ; Le Disquet, 1997). Un indice du vieillissement des organes est la nature polysaccharidique des structures et la faible proportion de protéines (Lapeyrie, comm. pers.). Nos résultats cytochimiques indiquent effectivement une forte proportion de polysaccharides et une faible teneur en protéines dans les structures des mycorhizes provenant du sol acide, alors que dans le sol calcaire elles sont très glycoprotéiques. En revanche, cette hypothèse est incompatible avec les fortes accumulations d'azote détectées. Toutefois, le sol podzolique est caractérisé par une litière de feuilles épaisse, ce qui laisse présager d'une forte quantité de substances azotées dans le sol et donc d'une plus grande proportion d'azote susceptible d'être absorbé par les organismes du sol. En été, dans le sol acide, la minéralisation de la matière organique est relativement efficace et libère de l'azote minéral. Par contre, le fonctionnement de la rendzine ne permet pas une accumulation de litière sur le sol et suppose donc une moins grande quantité d'azote disponible.

L'accumulation plus importante des ions en sol acide pourrait avoir également une origine plus physiologique. Ainsi, lorsque le sol est riche en éléments minéraux, le lactaire pourrait limiter fortement l'absorption des ions auxquels il peut être sensible, alors que dans des sols

Mycorhize de

Fagus sylvatica / Lactarius subdulcis

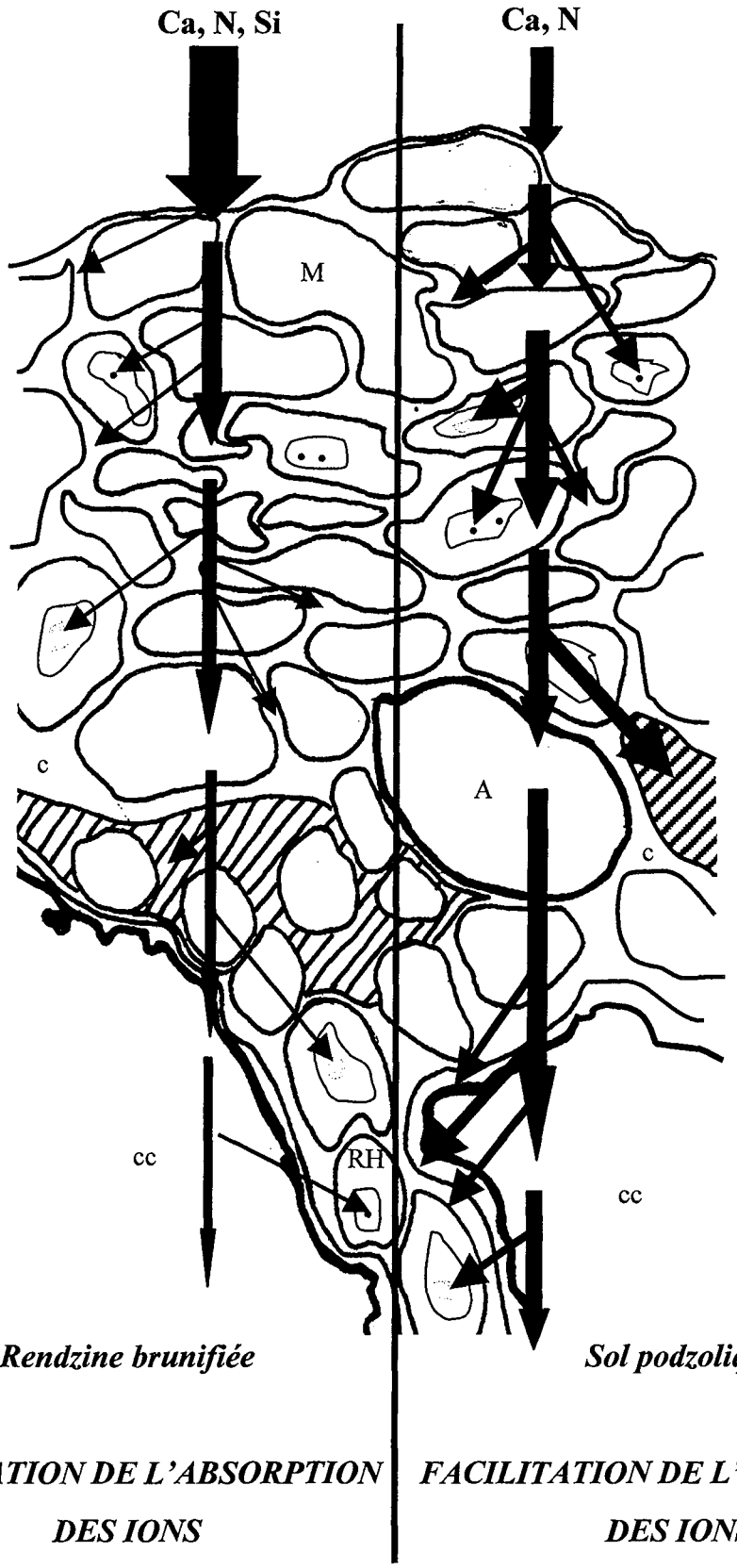


Figure 26 : Sites d'accumulation des éléments minéraux dans les différentes structures des mycorhizes de *Lactarius subdulcis* sur sol calcaire et sur sol acide. M : manteau fongique ; c : ciment ; RH : réseau de Hartig ; cc : cellule corticale ; A : Ascomycète associé ; ▨ : composés polyphénoliques ; ○ : globule azoté ; • : granule de polyphosphates.

pauvres, il faciliterait leur absorption de manière à assurer ses besoins en nutriments tout en régulant leur transport vers la racine. C'est ainsi qu'un certain effet filtre exercé par *Lactarius subdulcis* a été observé, en été, dans le sol acide. En effet, les fortes proportions de calcium détectées dans le champignon ne sont pas retrouvées dans la racine. Ce rôle de filtre est notamment assuré par l'élaboration de granules aptes à bloquer les ions calcium et à les transférer progressivement à la racine.

Parmi les stratégies de stockage des éléments minéraux, des structures fongiques particulières sont élaborées : les granules de polyphosphates et les globules azotés.

Dans les mycorhizes de *Cenococcum geophilum*, sur la rendzine, les granules de polyphosphates ont été observés dans les vacuoles des hyphes du manteau alors que les globules azotés semblent cantonnés aux vacuoles des hyphes formant le réseau de Hartig. Cela semble incompatible avec l'hypothèse émise dans le chapitre I, selon laquelle la formation de globules azotés serait corrélée avec la présence d'une dose massive de calcium. Cependant, il est possible que la quantité d'ions calcium bloquée dans le mucilage, dans les composés polyphénoliques et dans les granules de polyphosphates, constitue un système suffisant pour éviter une surdose de calcium et la perturbation de l'homéostasie calcique au niveau des hyphes. La formation de globules azotés ne serait alors pas nécessaire. Cela sous-entend une hiérarchisation dans la capacité des différentes structures fongiques de la mycorhize à fixer les éléments, ce qui est sans doute à mettre en relation avec la composition chimique de ces structures et le nombre de charges négatives susceptibles de fixer les cations qu'elles présentent. D'autre part, la possibilité que le champignon limite l'absorption du calcium notamment par l'excrétion dans le milieu externe d'acides organiques ne peut être exclue.

Si l'on accepte cette hypothèse, la présence de globules azotés dans les vacuoles des hyphes du réseau de Hartig, est alors inattendue. Cependant, Strullu *et al.* (1986) ont indiqué que l'hydrolyse des granules de polyphosphates devait avoir lieu dans le réseau de Hartig, accompagnant ainsi le transfert de phosphore à la plante hôte. Cette hydrolyse libérerait du calcium qui pourrait en partie être transmis à la plante et s'accumulerait notamment dans les polyphénols vacuolaires des cellules corticales voisines du réseau. Toutefois, une certaine proportion de calcium doit rester stockée dans les hyphes du réseau de Hartig. Cette teneur pourrait alors induire un choc osmotique pour les hyphes, déclenchant ainsi la formation des globules azotés. Chez *Lactarius subdulcis*, les granules de polyphosphates et les globules azotés sont également observés. Ils renferment du calcium en assez grande proportion ainsi que des traces de silicium provenant de l'altération des argiles du sol.

Dans le sol acide, chez les deux champignons, des globules azotés ont été observés dans les vacuoles des hyphes du manteau fongique et de la zone d'échange. La formation des globules azotés serait alors due à un ou plusieurs autres éléments en plus du calcium. En effet, celui-ci, bien que peu abondant, reste le cation basique majoritaire. Dans un sol acide dont le pH est très bas, comme c'est le cas du sol podzolique, le complexe absorbant est principalement occupé par les protons et par les ions aluminium, ce dernier étant essentiellement sous une forme dite libre dans le sol. L'aluminium est alors directement accessible pour l'absorption. La toxicité de l'aluminium dans les sols acides est un phénomène bien connu. Cet élément pourrait ainsi contribuer à la formation des globules azotés. Van Pragg *et al.* (1985) ont montré notamment que *Fagus sylvatica* est une espèce forestière sensible à l'aluminium dont un excès provoque une baisse de la biomasse aérienne. De plus, nos analyses ont révélé que cet élément est par ailleurs présent dans les globules des hyphes des deux champignons. Cependant, dans le podzol, la chimie du sol veut que l'aluminium libre soit rapidement complexé par la matière organique abondante, évitant l'effet toxique qu'un excès aluminique libre dans le sol provoquerait (Roullier, comm. pers.). Toutefois, les organismes fongiques du sol possèdent les enzymes nécessaires à la dégradation de la matière organique permettant ainsi la solubilisation des ions aluminium qui peuvent alors être absorbés.

Du calcium et du silicium ont également été détectés dans ces globules azotés fongiques, sur le sol acide, indiquant qu'ils interviennent avec l'aluminium dans la formation des globules.

Le calcium, le silicium et l'aluminium pourraient donc être les principaux facteurs induisant la formation des globules azotés.

B. Comparaison des mycorhizes et de leurs racines porteuses

Dans les deux sols étudiés, les racines porteuses de mycorhizes sont pauvres en éléments (calcium, azote, silicium) comparées aux mycorhizes, particulièrement dans la rendzine où le calcium n'a pas été détecté dans l'ensemble des structures alors que l'azote est accumulé en faible proportion dans le cortex racinaire. Les analyses indiquent que les éléments recherchés ne sont pas ou très peu absorbés et stockés et que la racine porteuse assure essentiellement un rôle de conduction. Entourés d'un cortex dégénérescent et desquamé, l'endoderme puis le suber constituent alors des barrières pour l'absorption des ions et le passage d'organismes étrangers.

Un comportement particulier des racines porteuses a été observé dans le cas du silicium. Cet élément ne présente pas de rôle physiologique chez les arbres, mais peut cependant être absorbé en très faibles proportions puisque sa présence a été révélée lors des analyses. Dans les deux sols étudiés, le silicium provient de l'altération des argiles par les pluies. Son absorption est

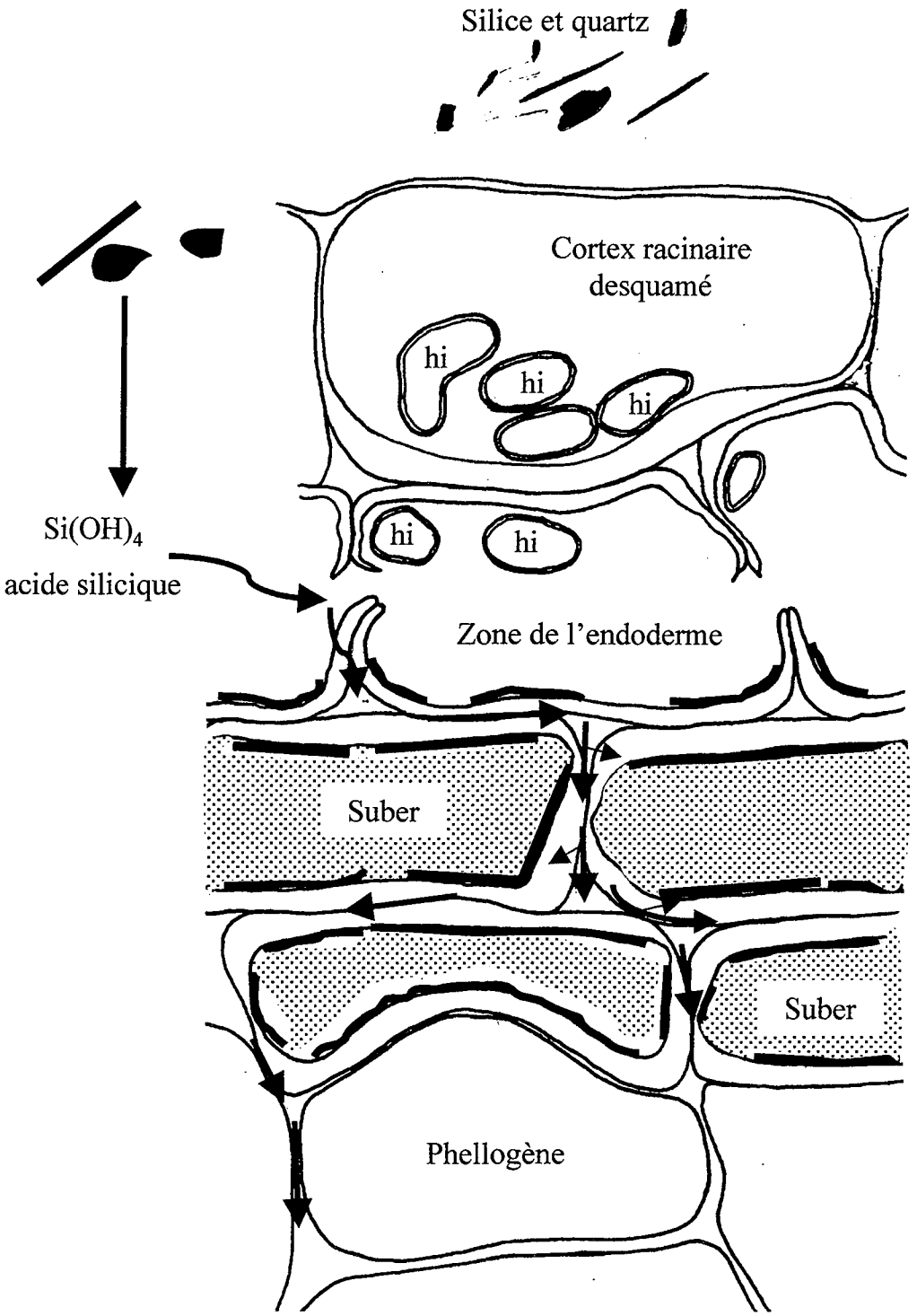


Figure 27 : Schéma hypothétique du transport du silicium dans la racine, conduisant à la formation de la bande de silice contre la paroi interne des cellules de l'endoderme et du suber dans les racines porteuses de mycorhizes. ▒ : composés polyphénoliques.

de type passif grâce au courant d'évapotranspiration et se fait sous la forme d'acide silicique neutre $Si(OH)_4$ (Bartoli, 1981). Il est d'une plus grande importance chez certaines plantes herbacées comme les carex ou les prêles, où il participe à la rigidification des structures végétales et plus particulièrement des parties aériennes (Marschner, 1986).

Au niveau des feuilles des herbacés (Robert *et al.*, 1973), le silicium se dépose principalement dans les stomates et dans les cellules épidermiques. Arrivé dans les vacuoles des cellules de l'épiderme, il s'associerait avec des protéines pour former des précipités fibrillaires ; de là, le silicium passerait à nouveau dans le cytoplasme, puis serait stocké dans la paroi sur une trame polysaccharidique (callose, cellulose) (Robert *et al.*, 1973). La formation de complexes protéiques avec l'acide silicique pourrait également avoir lieu dans les racines puisqu'un marquage par le réactif de Gomori-Swift a été observé au niveau des cellules de l'endoderme et du suber dans les racines porteuses de mycorhizes du sol calcaire comme du sol acide. Le silicium absorbé pénétrerait dans les cellules par les parois (figure 27). Les cellules étant remplies de composés polyphénoliques et étant donc mortes, l'acide silicique resterait bloqué contre la paroi au niveau de laquelle il se fixe sur les charges négatives des acides organiques pariétaux (notamment des acides uroniques). Une situation similaire pourrait se produire au niveau du suber excepté lorsque les cellules sont encore vivantes puisque la couche de silice n'est alors pas observée.

La non détection du silicium dans les autres structures racinaires et notamment dans le liseré interne de la paroi des vaisseaux du xylème des racines porteuses indique sans doute qu'il ne se fixe pas, même momentanément, à la paroi des vaisseaux et qu'il est transporté en continu.

La formation de la bande de silice serait donc un mécanisme complémentaire de l'imperméabilisation des parois cellulaires de l'endoderme et du suber pour limiter l'absorption des éléments du sol privilégiant ainsi la fonction de conduction.

CONCLUSION :

Ce deuxième chapitre avait pour but de mettre en évidence un « effet sol » sur les mycorhizes et leurs racines porteuses pendant le période estivale.

- Le type de sol agit à différents niveaux sur les deux mycorhizes, d'une façon plus importante sur *Cenococcum geophilum* que sur *Lactarius subdulcis*.

♦ D'une part, il influe sur l'abondance mycorhizienne (les mycorhizes de *Cenococcum geophilum* sont dominantes dans le sol calcaire et rares dans le sol acide ; la situation inverse est observée pour les mycorhizes de *Lactarius subdulcis*).

♦ D'autre part, le comportement du champignon peut être différent (ectomycorhizien, ectendomycorhizien) selon le sol d'origine. *Lactarius subdulcis* est exclusivement ectomycorhizien sur les deux sols alors que *Cenococcum geophilum* est ectomycorhizien sur le sol calcaire mais peut développer des ectendomycorhizes sur le sol acide. Trois hypothèses ont été émises pour expliquer ce fait : l'intervention du phosphore, celle de l'aluminium ou bien encore les phénomènes de compétition interspécifique. Toutefois, une fonction saprophyte de *Cenococcum* ayant déjà été révélée, on ne peut exclure que cette modification de l'ultrastructure mycorhizienne soit due à d'autres facteurs (compétition interspécifique, ...) plutôt qu'à un « effet sol » uniquement.

- De plus, *Cenococcum geophilum* semble moins sensible aux ions calcium et au pH que *Lactarius subdulcis*. Les deux champignons peuvent faire face aux éléments du sol en excès de différentes façons :

♦ Par la présence de structures (composés polyphénoliques, mucilage) propres à stocker les éléments minéraux, régulant ainsi leur transfert vers le reste de la racine.

♦ Par l'élaboration de granules de polyphosphates et/ou de globules azotés, intervenant de manière sélective vis-à-vis des éléments minéraux du sol.

♦ Même si notre étude ne nous a pas permis de mettre clairement en évidence une limitation de l'absorption des ions par les champignons, ce phénomène ne peut être exclu.

- Lors de l'absorption d'une dose massive d'un élément minéral, il semble que les structures les mieux adaptées stockent majoritairement l'élément concerné, alors que d'autres structures n'accumulent pas l'ion. En revanche, lorsque l'élément n'est pas présent en dose toxique, il n'y a pas d'accumulation particulière mais un transport régulé vers la racine.

- Les racines porteuses de mycorhizes présentent une très faible capacité à absorber les éléments du sol comparées aux mycorhizes. Pour cela, les cellules de leur endoderme ainsi que celles du suber sont remplies de composés polyphénoliques qui constituent une protection physique contre un envahissement par des organismes étrangers et une protection contre l'absorption d'éléments présents en abondance dans le milieu extérieur. Ces barrières sont renforcées par la présence d'une couche de silice contre la paroi interne des cellules endodermiques et du suber. Les racines porteuses de mycorhizes assurent essentiellement une fonction de conduction.

CHAPITRE II :

PLANCHES XII A XX

ETUDES MORPHOLOGIQUE ET HISTOCHIMIQUE DES MYCORHIZES NATURELLES DE *Fagus sylvatica* L. EN ASSOCIATION AVEC *Cenococcum geophilum* L.

Site de prélèvement : **site de Bezange, sol podzolique.**

Période de prélèvement : **été 1996.**

Coloration par le bleu de toluidine

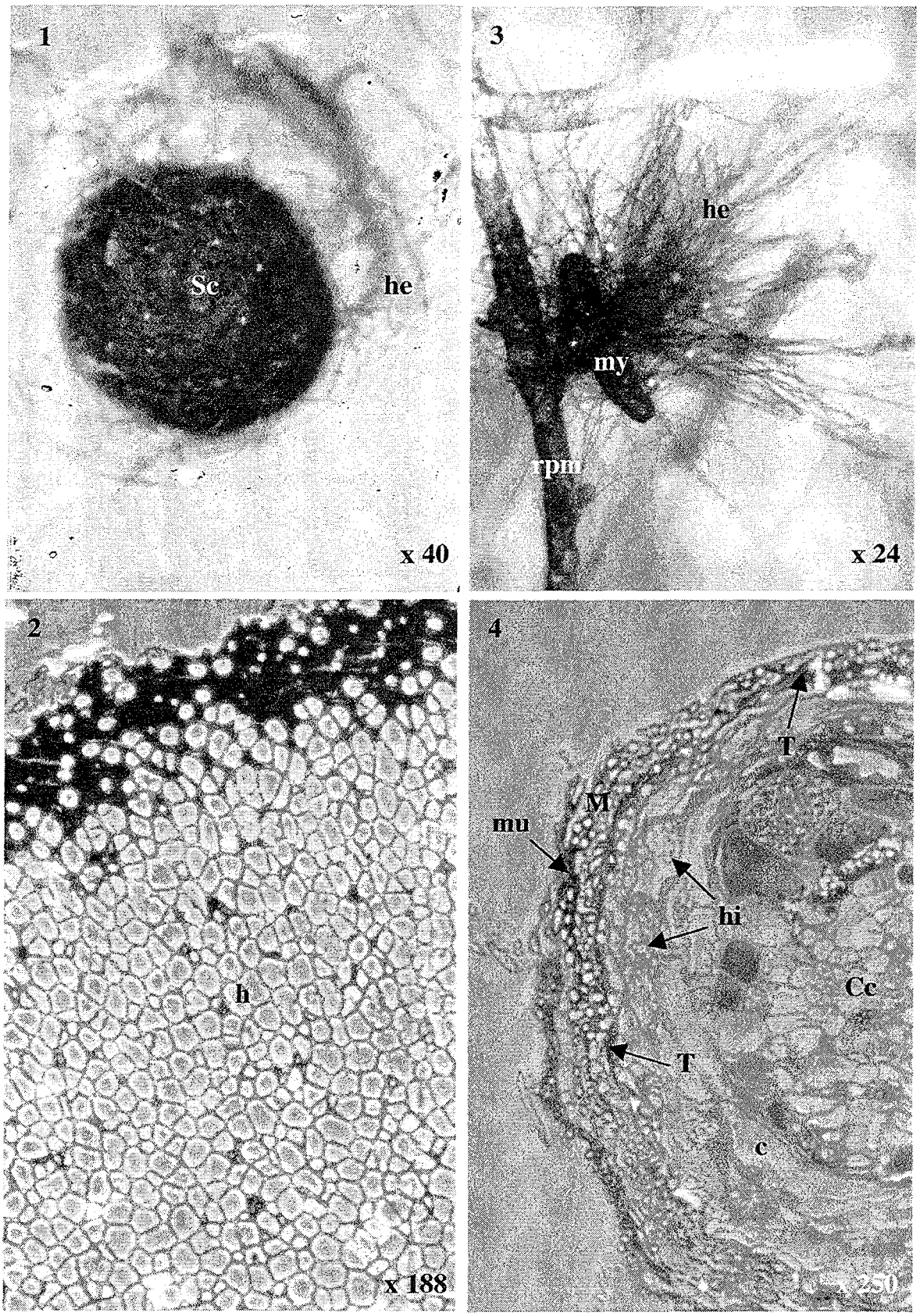
Figure 1 : Observation d'un sclérote (Sc) élaboré par *Cenococcum geophilum*. Cette masse est de la couleur du mycélium végétatif de *Cenococcum*, c'est-à-dire noir charbon. Du mycélium extramatriciel (he) se dégage du sclérote. x 40

Figure 2 : Portion d'une coupe transversale d'un sclérote de *Cenococcum geophilum* observé en microscopie photonique. Cette forme de résistance du champignon est constituée par un amas d'hyphes jointives (h). Les couches superficielles d'hyphes sont enrobées dans un matériel noir. x 188

Figure 3 : Vue externe de mycorhizes (my) de *Cenococcum geophilum*. Des hyphes extramatricielles (he) très abondantes se dégagent des mycorhizes. Le mycélium entoure également une portion de racine porteuse de mycorhizes (rpm). x 24

Figure 4 : Coupe transversale d'une mycorhize de *Cenococcum geophilum* observée en microscopie photonique. Le manteau (M) est recouvert par du mucilage (mu). Des plages polyphénoliques (T) sont observées à la limite inférieure du manteau. Des hyphes intracellulaires (hi) sont visibles dans les deux premières assises de cellules corticales. Le cortex profond (c) est généralement dépourvu de mycélium. Le cylindre central (Cc) est constitué de structures primaires. x 250

PLANCHE XII



ETUDE ULTRASTRUCTURALE DES MYCORHIZES NATURELLES DE *Fagus sylvatica* L. EN ASSOCIATION AVEC *Cenococcum geophilum* L.

Site de prélèvement : **site de Bezange, sol podzolique.**

Période de prélèvement : **été 1996.**

Double coloration par l'acétate d'uranyle – citrate de plomb

Figure 1 : Le manteau est recouvert par du mucilage (mu). Les hyphes (h) sont reliées entre elles par un ciment (c) abondant. Des plages de composés polyphénoliques (T) sont présentes dans la zone interne du manteau. Des petites vésicules blanches sont observées dans le cytoplasme des hyphes (flèche). x 5300

Figure 2 : Les hyphes du manteau (h) renferment de gros globules vacuolaires peu denses (flèches). T : composés polyphénoliques. x 14400

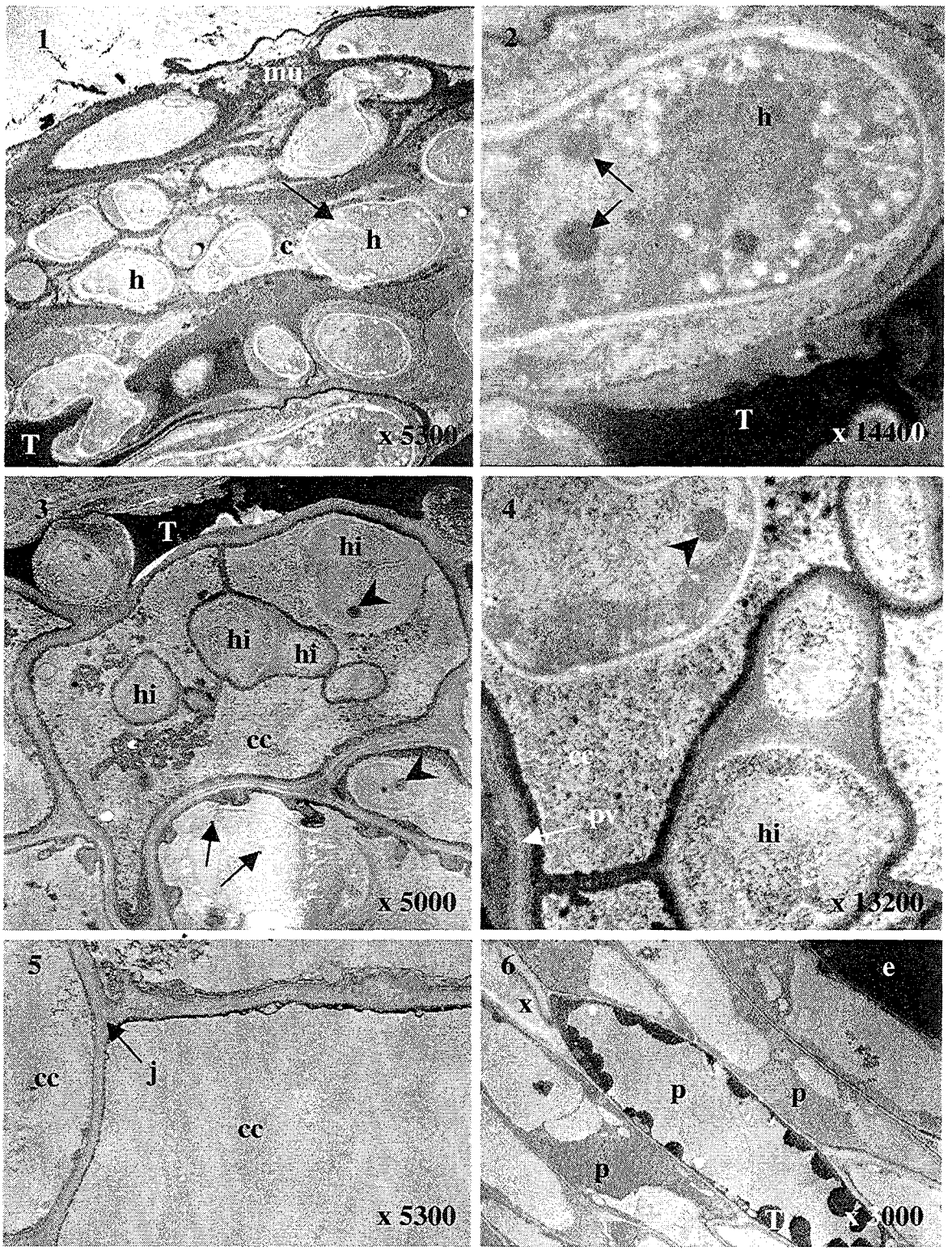
Figure 3 : Sous le manteau, les hyphes deviennent intracellulaires (hi) et aucun réseau de Hartig n'est observé. T : composés polyphénoliques ; cc : cellule corticale ; flèches : granules de polyphosphates ; têtes de flèches : globules azotés. x 5000

Figure 4 : Les hyphes intracellulaires (hi) sont entourées par une couche sombre correspondant à l'ensemble constitué par le plasmalemme, le cytoplasme et le tonoplaste de la cellule végétale. pv : paroi végétale ; cc : cellule corticale ; tête de flèche : globule azoté. x 13200

Figure 5 : Les cellules corticales (cc) du cortex profond sont volumineuses et leur cytoplasme est très réduit. j : jonctions cellulaires. x 5300

Figure 6 : Détail du cylindre central d'une mycorhize de *Cenococcum geophilum* en coupe longitudinale. x : xylème ; p : parenchyme ; e : endoderme ; T : composés polyphénoliques. x 3000

PLANCHE XIII



ETUDE ULTRASTRUCTURALE DES MYCORHIZES NATURELLES DE *Fagus sylvatica* L. EN ASSOCIATION AVEC *Lactarius subdulcis* Fr., ss. Q., Lange

Site de prélèvement : **site de Bezange, sol podzolique.**

Période de prélèvement : **été 1996.**

Double coloration acétate d'uranyle – citrate de plomb

Figure 1 : Le manteau est constitué d'un manteau externe (Me) et d'un manteau interne (Mi). Les hyphes sont reliées entre elles par du ciment (c). Des plages de composés polyphénoliques (T) sont présentes dans la zone interne du manteau. x 3200

Figure 2 : Dans le manteau, parmi les hyphes de *Lactarius subdulcis*, reconnaissable au dolipore (dp) bordant les septums, il est possible d'observé l'Ascomycète associé (A) dont la couche pariétale externe est sombre. T : composés polyphénoliques ; c : ciment ; flèches : granules de polyphosphates. x 7500

Figure 3 : Des globules azotés (têtes de flèche) sont présents dans les vacuoles des hyphes (h) du manteau de *Lactarius subdulcis*. c : ciment ; T : composés polyphénoliques. x 6700

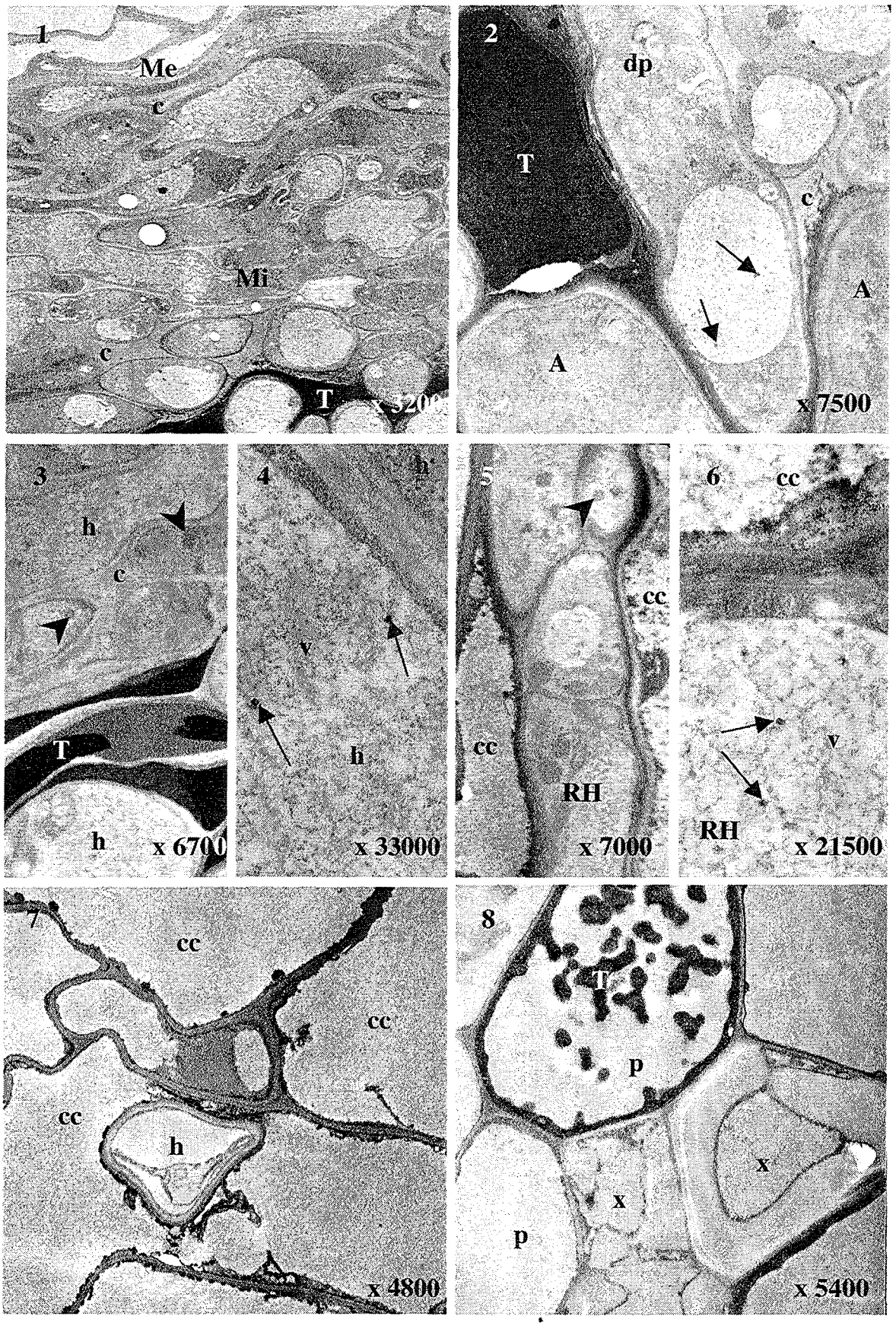
Figure 4 : Les vacuoles (v) des hyphes (h) du manteau de *Lactarius subdulcis* peuvent contenir également des granules de polyphosphates denses (flèches). x 33000

Figure 5 : Le réseau de Hartig (RH) est continu et unisérié. Les vacuoles des hyphes renferment des globules azotés peu denses (tête de flèche). cc : cellule corticale. x 7000

Figure 6 : Certaines hyphes du réseau de Hartig (RH) contiennent des granules vacuolaires denses (flèches). cc : cellule corticale ; v : vacuole. x 21500

Figure 7 : Les cellules corticales (cc) du cortex profond sont volumineuses et leur cytoplasme est très réduit. Des hyphes intracellulaires (h) peuvent être observées. x 4800

Figure 8 : Détail du cylindre central d'une mycorhize de *Lactarius subdulcis* en coupe transversale. x : vaisseaux xylémiens ; p : parenchyme ; T : composés polyphénoliques. x 5400


1
Me
c
Mi
c
T
2
dp
T
c
A
A
x 7500
3
h
c
T
h
x 6700
4
h
v
h
x 33000
5
cc
cc
RH
x 7000
6
cc
v
RH
x 21500
7
cc
cc
cc
h
x 4800
8
T
p
x
x
p
x 5400

ETUDE ULTRASTRUCTURALE DES RACINES PORTEUSES DE MYCORHIZES DE *Fagus sylvatica* L.

Site de prélèvement : **site de Bezange, sol podzolique.**

Période de prélèvement : **été 1996.**

Double coloration acétate d'uranyle – citrate de plomb

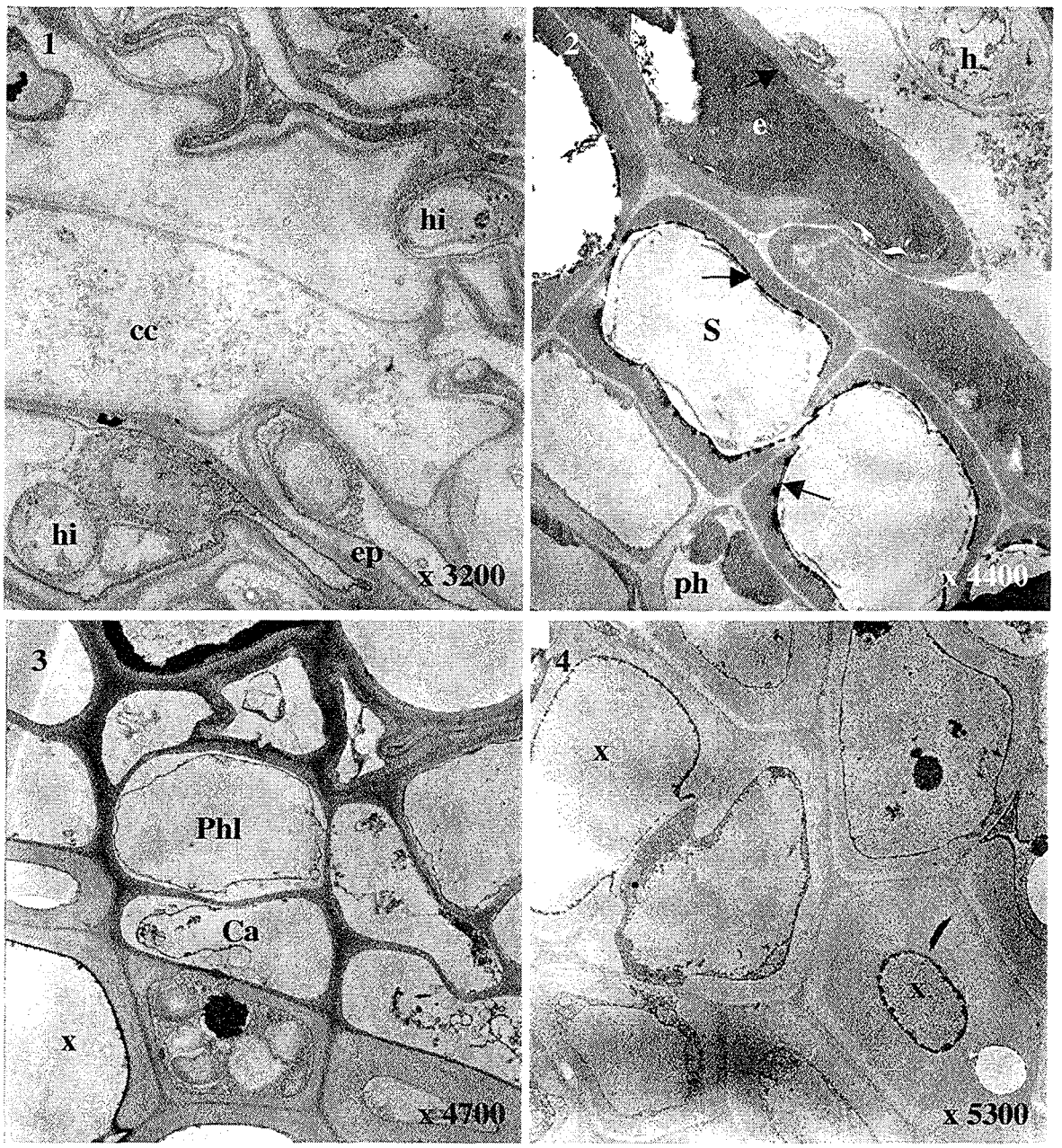
Figure 1 : Observation en microscopie électronique à transmission du cortex d'une racine porteuse de mycorhizes. Les cellules corticales (cc) renferment des hyphes (hi) et leur paroi présente un épaississement (ep) important. x 3200

Figure 2 : L'observation en microscopie électronique à transmission de la paroi des cellules de l'endoderme (e) et du suber (S) sous-jacent révèle la présence d'une couche dense sur sa face interne (flèches). h : hyphe ; ph : phellogène. x 4400

Figure 3 : Le cylindre central comprend des formations secondaires dont du cambium (Ca) produisant du xylème (x) et du phloème (Phl). x 4700

Figure 4 : Détail des vaisseaux du xylème (x). x 5300

PLANCHE XV



ETUDE CYTOCHIMIQUE DES MYCORHIZES NATURELLES DE *Fagus sylvatica* L. EN ASSOCIATION AVEC *Cenococcum geophilum* L.

Site de prélèvement : **site de Bezange, sol podzolique.**

Période de prélèvement : **été 1996.**

Mise en évidence des polysaccharides par le test PATAg

Figure 1 : Le mucilage (mu) et la paroi (pf) des hyphes (h) de la zone externe du manteau sont très réactives à ce test. En revanche, le ciment (c) ne présente aucun marquage. x 19000

Figure 2 : Dans la partie interne du manteau, la paroi (pf) des hyphes est fortement marquée alors que le ciment (c) interhyphal ne l'est pas. Le glycogène cytoplasmique (flèche) est également très réactif. Tête de flèche : globule azoté. x 15500

Figure 3 : Dans la zone d'échange entre les deux partenaires, les parois (pf) des hyphes intracellulaires (hi) et celles (pv) des cellules corticales (cc) réagissent fortement au test PATAg. Il en est de même du glycogène intracytoplasmique fongique (flèche). T : composés polyphénoliques. x 15700

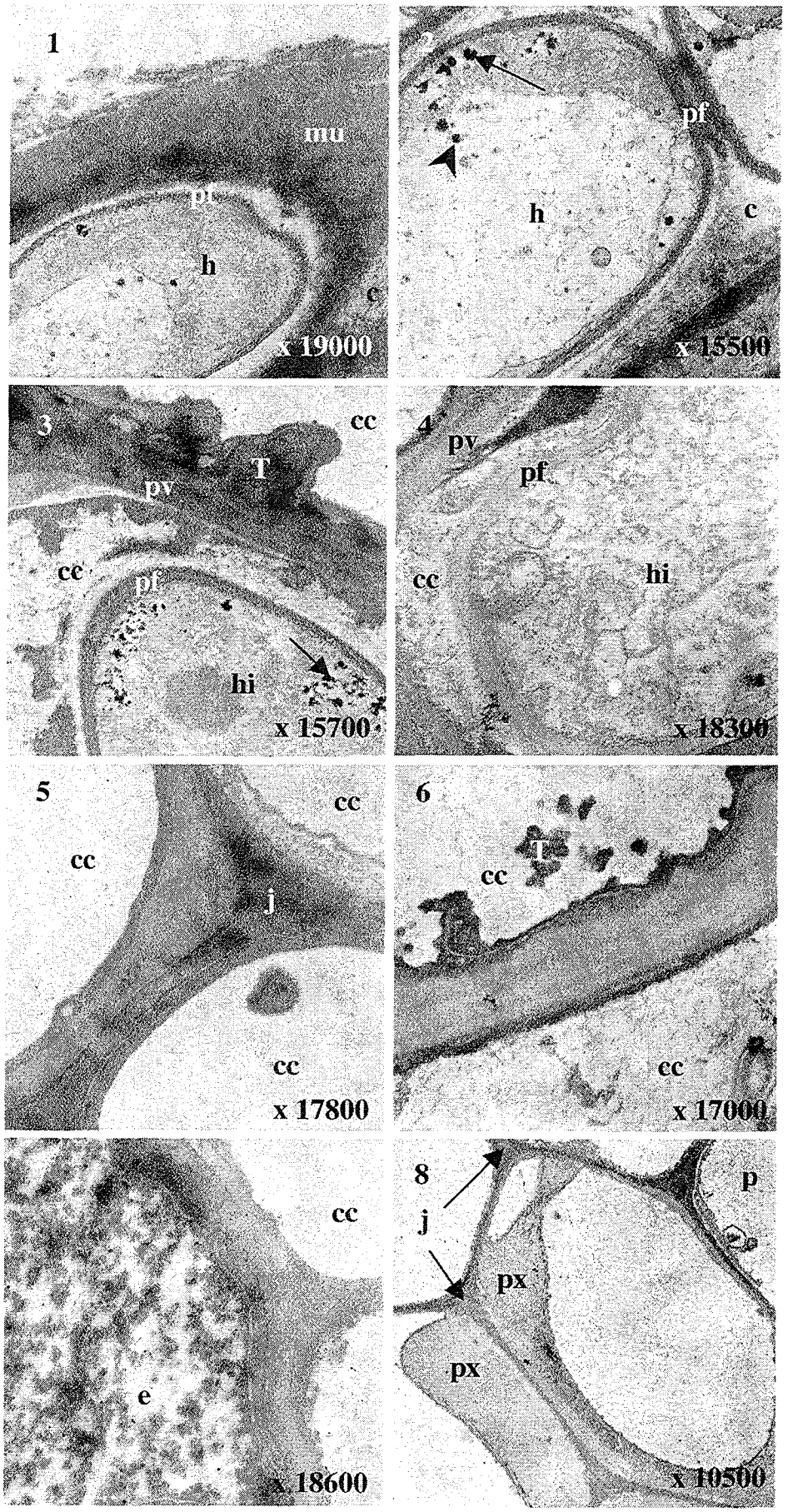
Figure 4 : Témoin du test PATAg. Aucun marquage n'est observé au niveau des parois (pf) des hyphes intracellulaires (hi) ni au niveau des parois (pv) des cellules corticales (cc) qui les contiennent, confirmant ainsi la nature polysaccharidique des parois. x 18300

Figure 5 : Dans le cortex profond, les parois des cellules corticales (cc) ainsi que les jonctions cellulaires (j) réagissent fortement au test PATAg. x 17800

Figure 6 : Témoin du test PATAg dans le cortex profond. Aucun marquage n'est observé au niveau des parois des cellules végétales (cc). Ces cellules peuvent renfermer dans leur vacuole des composés polyphénoliques (T). x 17000

Figure 7 : Les parois des cellules de l'endoderme (e) ne réagissent pas au test PATAg. cc : cellules corticales. x 18600

Figure 8 : Dans le cylindre central, les parois des cellules du parenchyme (p) ainsi que les jonctions cellulaires (j) sont fortement réactives au test PATAg. En revanche, les parois épaissies (px) des vaisseaux du xylème ne sont pas marquées. x 10500


1
mu
pf
h
c
x 19000
2
pf
h
c
x 15500
3
cc
T
pv
cc
pf
hi
x 15700
4
pv
pf
cc
hi
x 18300
5
cc
cc
j
cc
x 17800
6
T
cc
cc
x 17000
cc
e
x 18600
8
j
p
px
px
x 10500

ETUDE CYTOCHIMIQUE DES MYCORHIZES NATURELLES DE *Fagus sylvatica* L. EN ASSOCIATION AVEC *Cenococcum geophilum* L.

Site de prélèvement : **site de Bezange, sol podzolique.**

Période de prélèvement : **été 1996.**

Mise en évidence des protéines riches en cystine par le réactif de Gomori - Swift

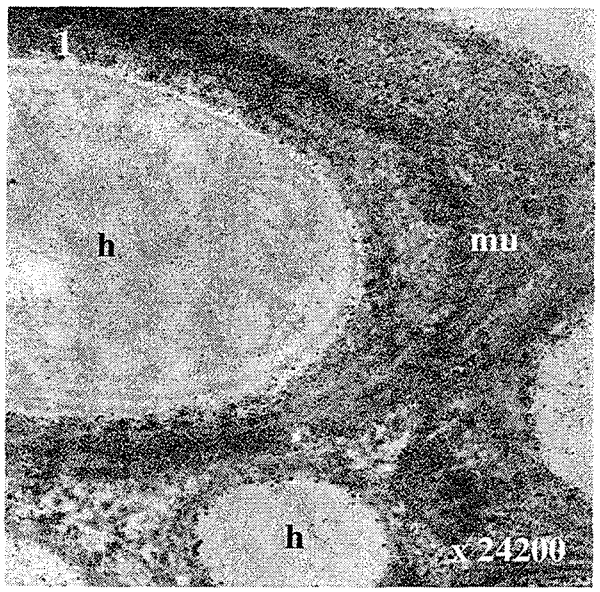
Figure 1 : Le mucilage (mu) présent en surface de la mycorhize est très réactif par endroit. Il en est de même des parois des hyphes (h) les plus externes. x 24200

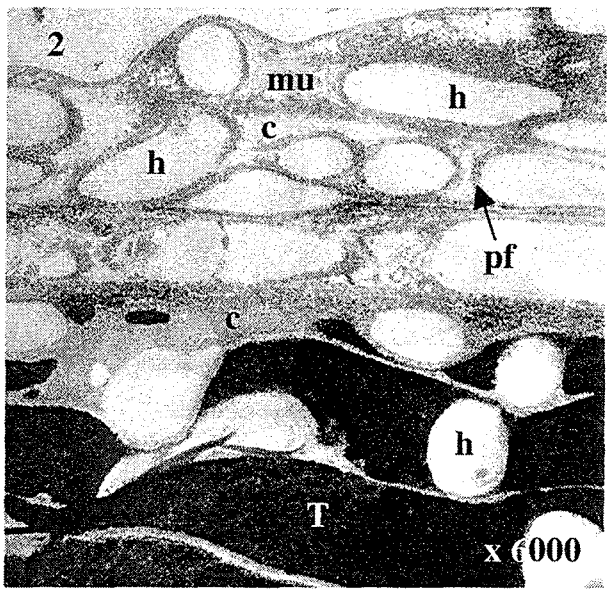
Figure 2 : Le ciment interhyphal (c) de la zone externe du manteau n'est pas marqué par le réactif de Swift. En revanche, dans la zone interne du manteau, un marquage est observé au niveau des parois (pf) des hyphes (h) et du ciment interhyphal (c). T : composés polyphénoliques ; mu : mucilage. x 6000

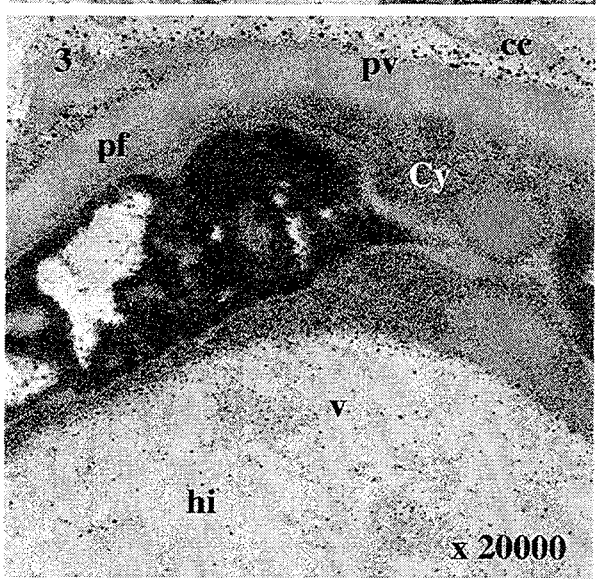
Figure 3 : Dans la zone d'échange entre les deux partenaires, les parois hyphales (pf) et végétales (pv) sont peu marquées par le réactif de Swift. Le cytoplasme (Cy) des hyphes (hi) réagit en revanche de manière intense. v : vacuole ; cc : cellule corticale. x 20000

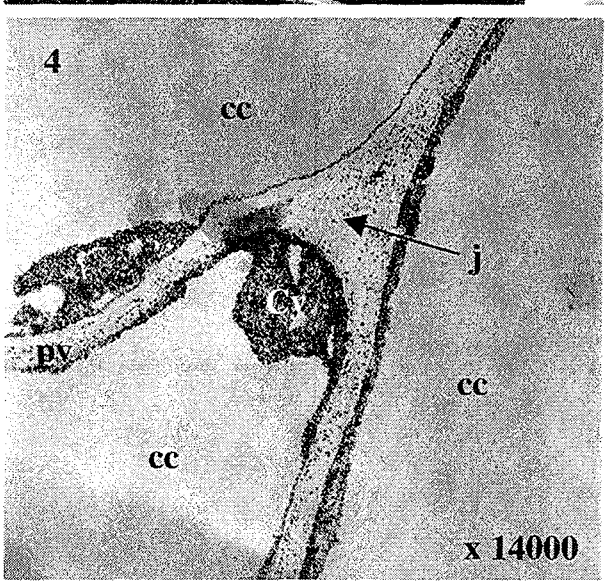
Figure 4 : Dans le cortex profond, les parois végétales (pv) et les jonctions cellulaires (j) sont peu ou pas marquées. Le cytoplasme (Cy) des cellules réagit fortement au réactif de Gomori-Swift.
x 14000

PLANCHE XVII









ETUDE CYTOCHIMIQUE DES MYCORHIZES NATURELLES DE *Fagus sylvatica* L. EN ASSOCIATION AVEC *Lactarius subdulcis* Fr., ss. Q., Lange

Site de prélèvement : **site de Bezange, sol podzolique.**

Période de prélèvement : **été 1996.**

Mise en évidence des polysaccharides par le test PATAg

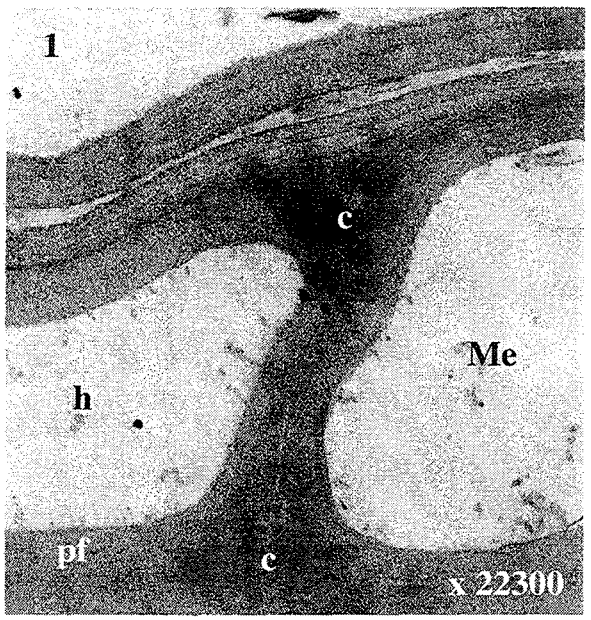
Figure 1 : Les parois (pf) des hyphes (h) du manteau externe (Me) ainsi que le ciment (c) sont très réactifs au test PATAg. x 22300

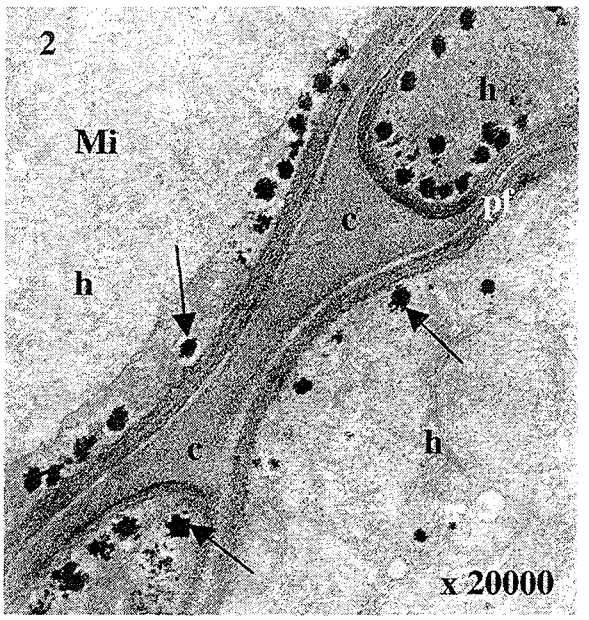
Figure 2 : Dans le manteau interne (Mi), les parois (pf) des hyphes (h) sont fortement marquées. Des rosettes de glycogène (flèches) sont observées dans le cytoplasme des hyphes et sont localisées dans des zones claires. x 20000

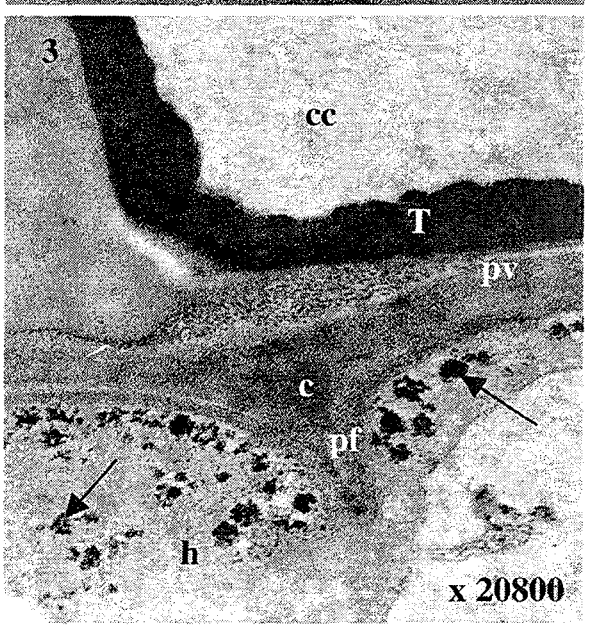
Figure 3 : Dans le réseau de Hartig, les parois (pf) des hyphes (h) et celles (pv) des cellules corticales (cc) sont marquées par le test PATAg. Il en est de même pour le ciment interhyphal (c). T : composés polyphénoliques ; flèches : glycogène fongique. x 20800

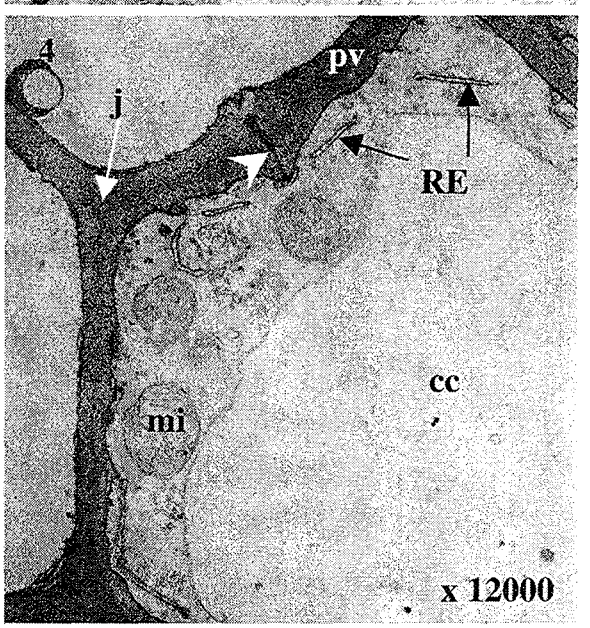
Figure 4 : Dans le cortex profond des mycorhizes de *Lactarius subdulcis*, les parois végétales (pv) et les jonctions cellulaires (j) sont marquées. Leur cytoplasme ne l'est pas. cc : cellule corticale ; mi : mitochondrie ; RE : réticulum endoplasmique ; tête de flèche : plasmodesme. x 12000

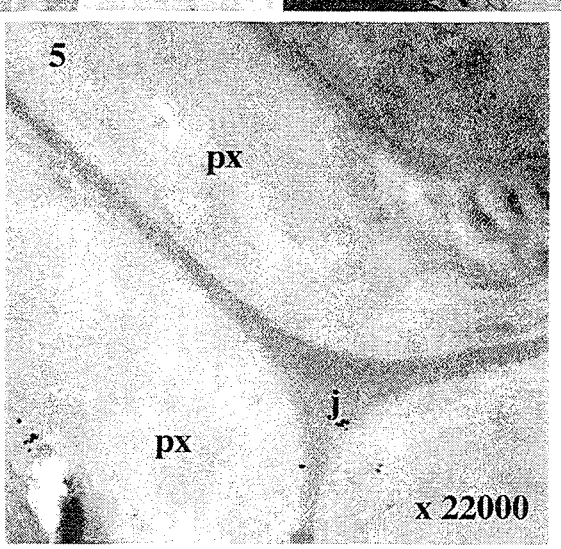
Figure 5 : Les jonctions cellulaires (j) et le liseré pariétal bordant la cavité des vaisseaux xylémiens réagissent au test PATAg. En revanche, la paroi épaissie (px) des vaisseaux xylémiens n'est pas réactive. x 22000


1
c
Me
h
pf
c
x 22300


2
Mi
h
c
pf
h
c
h
x 20000


3
cc
T
pv
c
pf
h
x 20800


4
pv
j
RE
cc
mi
x 12000


5
px
j
px
x 22000

ETUDE CYTOCHIMIQUE DES MYCORHIZES NATURELLES DE *Fagus sylvatica* L. EN ASSOCIATION AVEC *Lactarius subdulcis* Fr., ss. Q., Lange

Site de prélèvement : **site de Bezange, sol podzolique.**

Période de prélèvement : **été 1996.**

Mise en évidence des protéines riches en cystine par le réactif de Gomori - Swift

Figure 1 : Les parois (pf) des hyphes (h) du manteau externe réagissent fortement au réactif de Swift alors que le ciment (c) interhyphal ne montre aucun marquage. x 3600

Figure 2 : Dans le manteau interne, le ciment (c) n'est pas marqué. Il en est de même des parois (pf) des hyphes (h). En revanche, les globules vacuolaires sont fortement réactifs (têtes de flèches). Le cytoplasme des hyphes montre également un intense marquage. x 20000

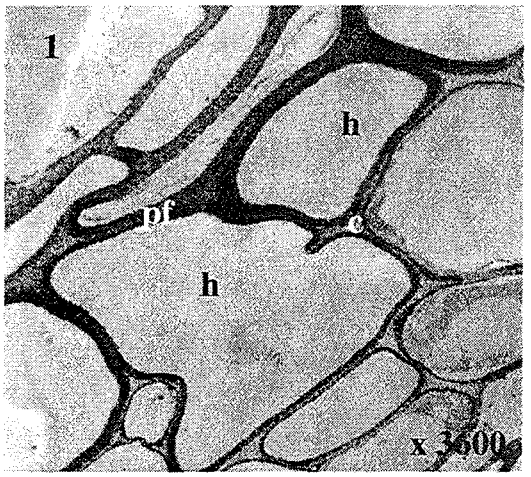
Figure 3 : Au niveau de l'Ascomycète associé à la mycorhize de lactaire, un marquage a été observé dans la couche pariétale externe (flèche) des hyphes ainsi que dans les corps de Woronin (w) bordant les septums des articles mycéliens. h : hyphe de *Lactarius subdulcis*. x 11000

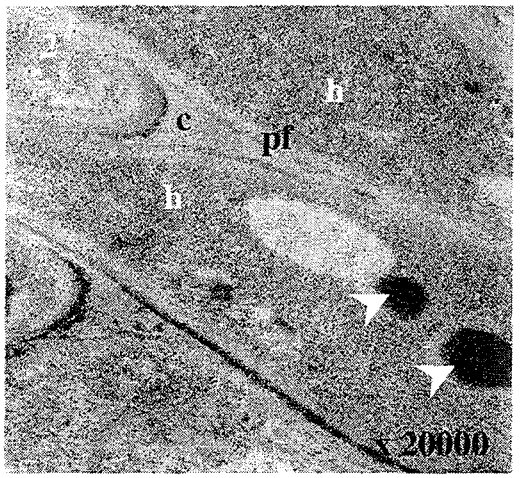
Figure 4 : Les parois (pf) des hyphes du réseau de Hartig (RH) ne sont pas réactives. Celles (pv) des cellules corticales (cc) voisines le sont légèrement. En revanche, le ciment (c) est fortement marqué par le réactif de Swift. Flèches : granules de polyphosphates ; T : composés polyphénoliques. x 26300

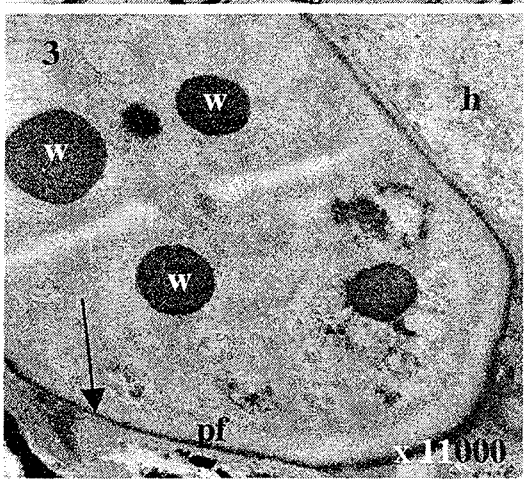
Figure 5 : Dans le cortex profond des mycorhizes de *Lactarius subdulcis*, les parois végétales (pv) ne sont pas marquées alors que leur cytoplasme est très réactif. De même, les jonctions cellulaires (j) sont fortement marquées. cc : cellule corticale ; mi : mitochondries. x 20000

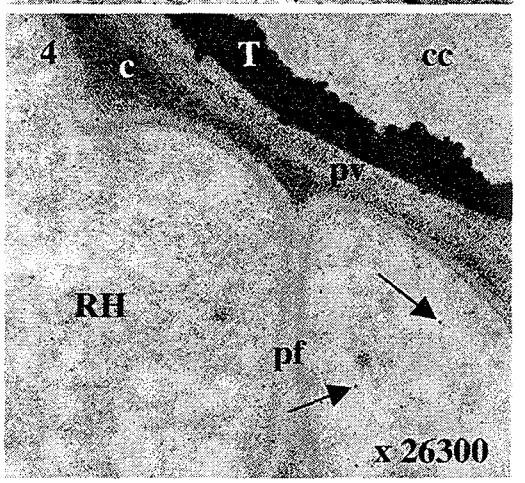
Figure 6 : Dans le cortex profond, l'Ascomycète (A) associé à la mycorhize de lactaire peut être observé dans les cellules corticales (cc). Un marquage est remarqué au niveau de la couche pariétale externe (flèche) des hyphes alors que la couche pariétale interne n'est pas marquée. En revanche, le cytoplasme (Cy) des cellules corticales est très réactif. x 6500

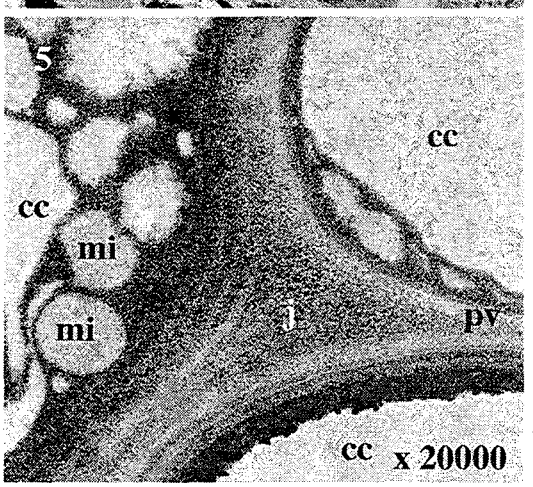
Figure 7 : La paroi des cellules du parenchyme médullaire (p), les jonctions cellulaires (j) et les parois des vaisseaux xylémiens réagissent fortement au réactif de Swift. x 4000

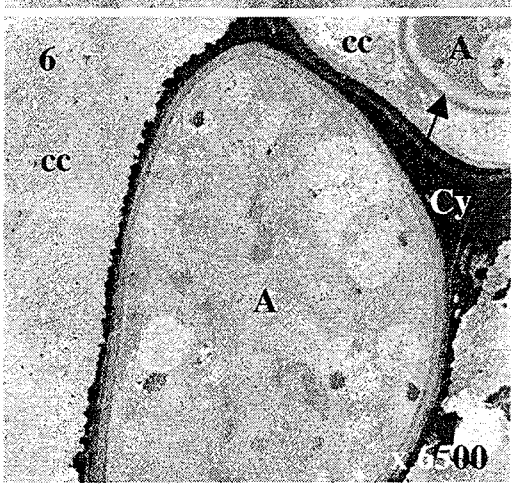

1
h
pf
c
h
x 3600

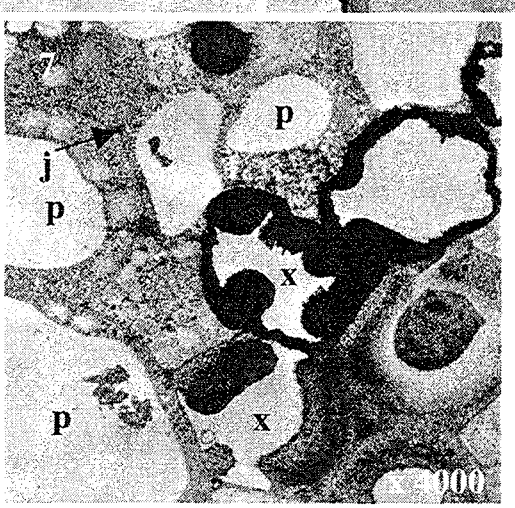

h
c
pf
h
x 20000


3
w
w
h
w
pf
x 11000


4
c
T
cc
pv
RH
pf
x 26300


5
cc
cc
mi
mi
j
pv
cc
x 20000


6
cc
A
cc
Cy
A
x 7500


7
p
j
p
x
p
x
x 7000

ETUDE CYTOCHIMIQUE DES RACINES PORTEUSES DE MYCORHIZES DE *Fagus sylvatica* L.

Site de prélèvement : **site de Bezange, sol podzolique.**

Période de prélèvement : **été 1996.**

Figure 1 : Test PATAg de mise en évidence des polysaccharides. Les parois végétales (pv) ne présentent aucun marquage. Les jonctions cellulaires (j) réagissent faiblement. La paroi de certaines hyphes intracellulaires (hi) présente un marquage relativement peu intense alors que la paroi d'autres hyphes est fortement marquée. x 7500

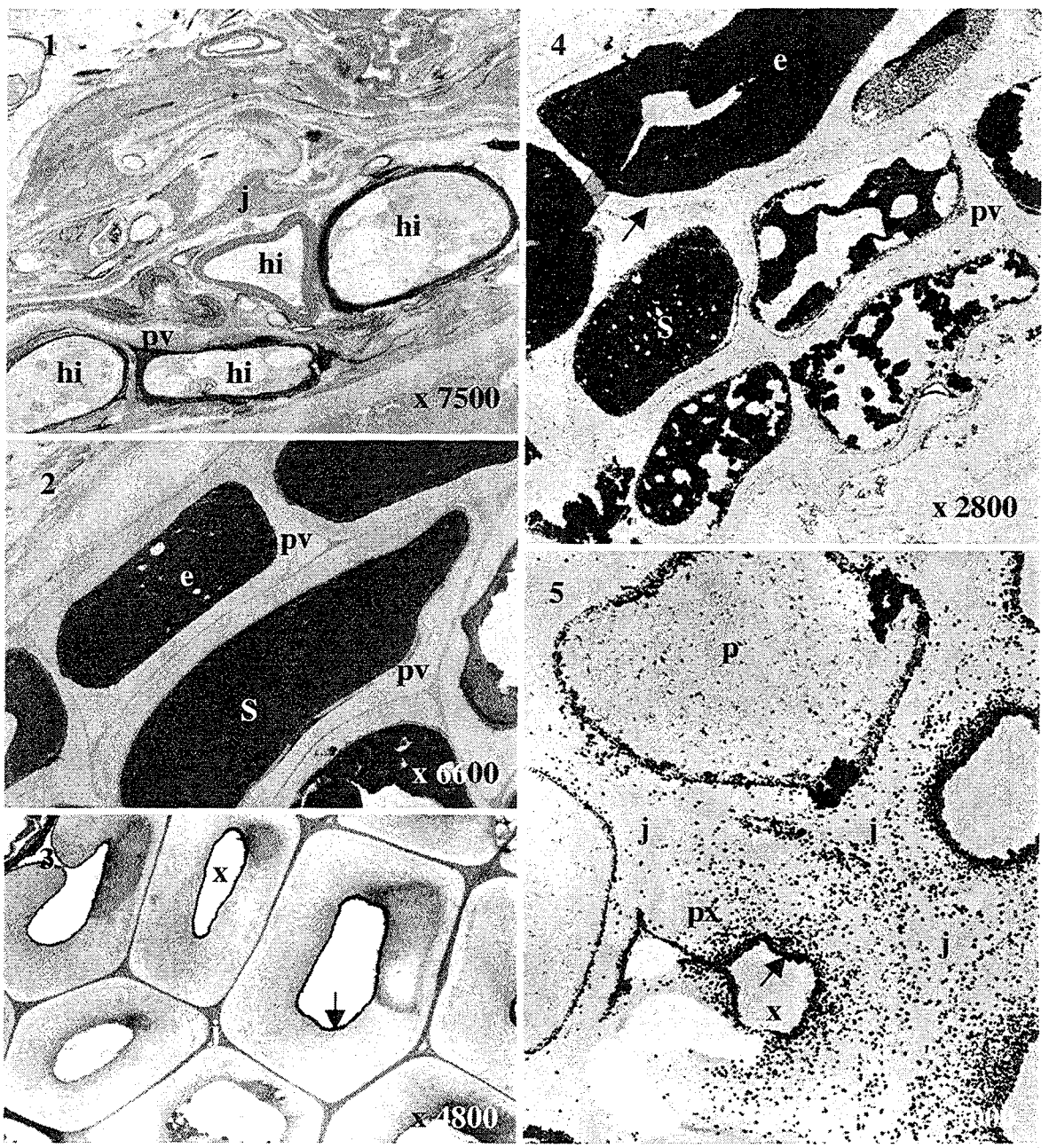
Figure 2 : Test PATAg de mise en évidence des polysaccharides. Aucun marquage n'est observé au niveau des parois (pv) des cellules de l'endoderme (e) et du suber (S). x 6600

Figure 3 : Test PATAg de mise en évidence des polysaccharides. Les jonctions cellulaires (j) sont fortement marquées par le test PATAg. Le liseré pariétal (flèche) bordant la cavité des vaisseaux xylémiens (x) réagit également intensément à ce test. x 4800

Figure 4 : Mise en évidence des protéines riches en cystine par le réactif de Gomori-Swift. Les parois cellulaires (pv) de l'endoderme (e) et du suber (S) ne sont pas marquées alors que la lamelle moyenne (flèche) est réactive. Il est possible d'observer un marquage intracellulaire (*) lorsque les cellules ne sont pas envahies de composés polyphénoliques.
x 2800

Figure 5 : Mise en évidence des protéines riches en cystine par le réactif de Gomori-Swift. La paroi épaissie des vaisseaux (px) montre un léger marquage. Le liseré pariétal (flèche) qui borde la cavité des vaisseaux est en revanche fortement marqué. Les jonctions cellulaires (j) ne sont pas réactives. x 7000

PLANCHE XX


1
j
hi
hi
pv
hi
hi
x 7500
2
pv
e
pv
S
x 6600
3
x
x 4800
4
e
pv
S
x 2800
5
p
j
j
px
j
x

CHAPITRE III :

EVOLUTION SAISONNIERE DES MODELES MYCORHIZIENS

ET

DE LEURS RACINES PORTEUSES.

INTRODUCTION :

Les résultats présentés dans les deux premiers chapitres de ce travail, ont montré que les conditions pédologiques (pH, teneur en ions calcium) du milieu peuvent influencer la proportion des mycorhizes étudiées mais aussi leur organisation mycorhizienne.

Cependant, dans la nature, le milieu et les organismes sont également soumis aux variations climatiques.

I. INFLUENCE DES CONDITIONS CLIMATIQUES SUR LE SOL

L'évolution saisonnière des activités biologiques et biochimiques du sol est influencée par différents facteurs. Les plus importants sont l'apport en nutriments, la température et le régime hydrique du sol.

C'est ainsi que les différentes activités au sein d'un sol sont inhibées pendant l'hiver lorsque les températures sont très basses (Rastin *et al.*, 1990). Toutefois, la présence d'une litière épaisse, comme c'est le cas pour le sol podzolique du site de Bezange, ou d'une couche de neige suffisante en hiver, peut protéger le sol et permettre une activité continue.

La décomposition de la matière organique fraîche est tributaire de divers facteurs et exige notamment une humidité suffisante. Elle est ainsi fortement ralentie en milieu trop sec. Griffiths *et al.* (1990) ont décrit une variation saisonnière de la minéralisation de l'azote dans des sols à mor granulaires ou non. Celle-ci est élevée en mars, puis diminue de manière importante jusqu'en mai et se maintient à un niveau faible le reste de l'année. Jussy (1998) a également définit une minéralisation de l'azote élevée en été et faible en hiver dans une hêtraie reposant sur un podzosol ocrique de pH voisin de 4.

Griffiths *et al.* (1990) ont par ailleurs observé dans leurs sites d'étude des taux de dénitrification élevés de mai à juillet et de novembre à janvier. Cette dénitrification correspondrait à une mise en réserve du nitrate de manière à limiter les pertes par lessivage pendant les périodes de grande pluviométrie.

II. INFLUENCE DES CONDITIONS CLIMATIQUES SUR LES ORGANISMES DU SOL

Les facteurs climatiques influent de différentes façons sur les organismes du sol. Ils peuvent agir sur leur vitalité mais également sur leur activité colonisatrice ou de décomposition.

Ainsi, Harvey *et al.* (1978) ont observé que seulement 5% des ectomycorhizes de Douglas sont actives pendant l'hiver du fait des températures froides. Cela rejoint les constatations de

Blasius *et al.* (1989) sur les ectomycorhizes de *Picea abies*. Le nombre important de mycorhizes endommagées ou mortes en hiver s'accompagne aussi d'une faible proportion de mycorhizes en croissance. D'autre part, Bentivenga et Hetrick (1992) ont montré une colonisation des racines par les champignons mycorhiziens réduite en hiver.

En revanche, la remontée printanière des températures induit une reprise de l'activité biologique. Mercé (1987) a remarqué au printemps, lorsque les températures dépassent 9°C, une augmentation du nombre d'espèces actives d'Hyphomycètes aquatiques dans un ruisseau de vallon recevant des feuilles d'arbres variés.

Les variations saisonnières des températures définissent en partie la phénologie des plantes. C'est ainsi que Bentivenga et Hetrick (1992) ont indiqué que le développement de Poacées de saison fraîche se produit au printemps alors que celui des Poacées de saison chaude à lieu en été. De plus, les températures peuvent agir sur la morphogenèse des plantes, notamment sur la production de racines latérales (Bowen, 1970) ou encore sur les teneurs en éléments minéraux des parties aériennes (Le Tacon et Toutain, 1973 ; Nasholm et Ericsson, 1990 ; Hasnaoui *et al.*, 1996). Les tendances de variation diffèrent selon les éléments considérés. Cependant, diverses études ont montré que le carbone, l'azote et le magnésium sont à un niveau élevé au printemps puis diminuent globalement pendant le reste de l'année (Le Tacon et Toutain, 1973 ; Hasnaoui *et al.*, 1996). A l'inverse, le calcium tend à s'accumuler dans les organes aériens pendant la saison de végétation.

Si les variations saisonnières concernant le fonctionnement des plantes se sont développées, celles sur l'ultrastructure et l'absorption de certains éléments minéraux du sol par les mycorhizes le sont moins. Il nous a donc paru intéressant d'étudier la morphologie, l'ultrastructure des mycorhizes pendant les froids hivernaux, lors de la reprise de la végétation au printemps, pendant la période estivale et au cours de la fructification fongique automnale. Cela permettra une approche de la connaissance du fonctionnement de la symbiose au cours des saisons en le reliant notamment à l'état physiologique des deux partenaires.

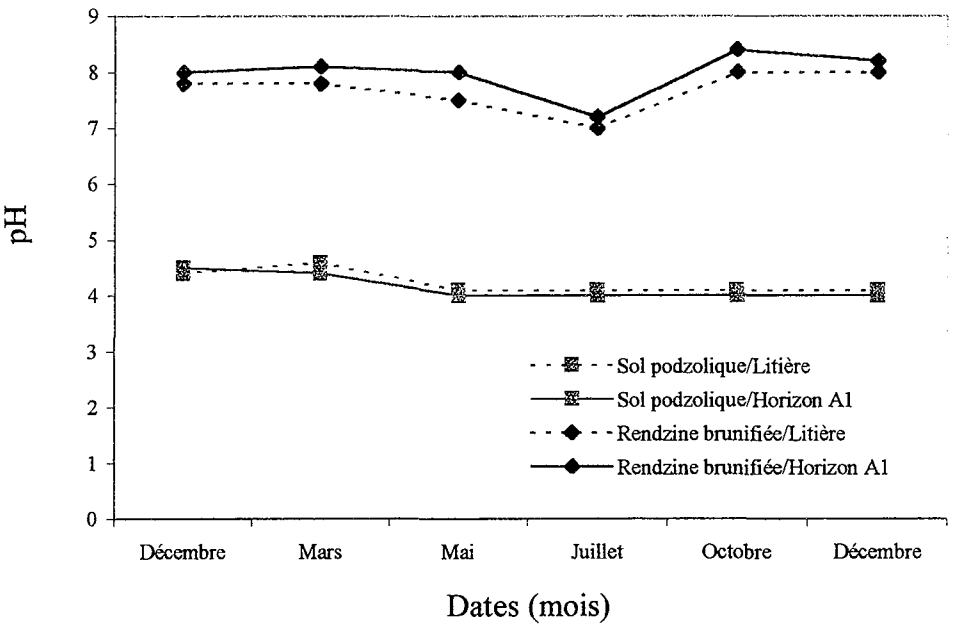


Figure 28: Variation saisonnière du pH de la litière et de l'horizon A1 de chaque sol, de décembre 1995 à décembre 1996.

RESULTATS :

Dans le but d'observer des modifications de la morphologie et de la nutrition des mycorhizes en fonction des saisons, l'étude des mycorhizes à *Cenococcum geophilum* et à *Lactarius subdulcis* et de leurs racines porteuses, a donc été réalisée pendant les trois autres périodes de l'année : au printemps, à l'automne et en hiver. Ainsi pourront être comparés les résultats obtenus sur ces organes pendant la période estivale.

L'évolution saisonnière de pH des deux sols a également été suivie (figure 28). Ainsi, le pH (eau) de la litière et celui de l'horizon organo-minéral A1 de chacun des deux sols ne présentent que de faibles variations au cours des saisons. Au niveau du sol podzolique, le pH(eau) est compris entre 4,5 et 5 pendant l'hiver et s'est abaissé à 4 le reste de l'année. Dans la rendzine brunifiée, le pH(eau) était proche de 8 pendant l'hiver et au printemps, a montré une légère baisse en été (pH voisin de 7) puis une augmentation à l'automne (pH de l'ordre de 8,5).

Chapitre III.1 : SUR LA RENDZINE BRUNIFIEE

I. LES MYCORHIZES DE *CENOCOCCUM GEOPHILUM*

A. ETUDES MORPHOLOGIQUE ET HISTOLOGIQUE

Au printemps, à l'automne et en hiver, l'aspect morphologique des mycorhizes noires à *Cenococcum geophilum* ne varie pas. Elles constituent, comme cela a déjà été observé en été, le type mycorhizien dominant dans le système racinaire du Hêtre sur ce sol.

Leur organisation structurale reste également la même. Il s'agit d'ectomycorhizes formées d'un manteau fongique épais comprenant quatre à cinq couches d'hyphes et qui est recouvert d'un mucilage sombre plus ou moins épais ; et d'un réseau de Hartig unisérié et continu constitué d'hyphes de petite section. La limite inférieure du manteau est marquée par des plages de composés polyphénoliques sombres.

Les tissus racinaires présentent un aspect inchangé par rapport à celui présenté précédemment. En effet, le cortex est composé de cellules corticales volumineuses et le cylindre central est réduit et ne présente que des formations primaires.

B. ETUDE ULTRASTRUCTURALE

Globalement, l'ultrastructure des mycorhizes à *Cenococcum geophilum* observée au printemps, à l'automne et en hiver est similaire à celle présentée pour l'été. Il s'agit d'une

	CONSTITUANTS	RENDZINE BRUNIFIEE					
		PRINTEMPS		*AUTOMNE*		*HIVER*	
		Polysaccharides	Protéines	Polysaccharides	Protéines	Polysaccharides	Protéines
Surface	Mucilage	++	++	++	++	++	(+)
Manteau externe	Parois fongiques	+	-	++	++	++	+
	Ciment	++	(+)	++	++	++	+
Manteau interne	Parois fongiques	+	-	+	++	++	+++
	Ciment	+	+	++	++	++	+++
	Glycogène	+++	-	+++	-	+++	-
Réseau de Hartig	Parois fongiques	-	-	+(+)	+	-	++
	Parois des cellules corticales	+	-	+	++	+	++
	Ciment	++	+++	+	-	+	++
	Glycogène	+++	-	+++	-	+++	-
Cortex	Parois des cellules corticales	++	+	-	-	-	++
	Jonctions cellulaires	++	+	-	-	-	++
	Parois des cellules endodermiques	-	+	-	-	-	-
Cylindre central	Parois des cellules du péricycle	-	-	-	-	-	-
	Parois des cellules du parenchyme	++	+++	+	++	++	+
	Jonctions cellulaires	++	+++	++	++	++	+
	Parois lignifiées des vaisseaux	-	++	-	+(+)	-	+
	Liseré interne des parois du xylème	++	+++	++	+++	+	+

Tableau 17 : Organisation et nature glycoprotéique des constituants formant les structures présentes dans les mycorhizes de *Fagus sylvatica* / *Cenococcum geophilum* récoltées dans la rendzine brunifiée au cours des saisons.

organisation ectomycorhizienne (Planche XXI, Fig. 1). Cependant, à l'automne, le manteau fongique épais se subdivise en un manteau externe mort et un manteau interne vivant. Une autre différence se situe dans la distribution des granules et des globules vacuolaires fongiques : au printemps, en plus des granules de polyphosphates présents dans le manteau (Planche XXI, Fig. 2) et des globules dans le réseau de Hartig (Planche XXI, Fig. 4), comme cela a été observé en juillet, il se développe des globules vacuolaires dans le manteau (Planche XXI, Fig. 3). Une situation identique a été notée en hiver (Planche XXI, Fig. 8, 9 et 10). A l'automne, les globules fongiques vacuolaires sont observés dans le manteau (Planche XXI, Fig. 5) mais granules et globules sont absents dans le réseau de Hartig (Planche XXI, Fig. 6 et 7).

Les cellules corticales sont vivantes et leur cytoplasme réduit peut renfermer des organites reconnaissables, notamment des mitochondries et du réticulum endoplasmique. Dans le cylindre central, les cellules du parenchyme possèdent une vacuole volumineuse qui peut ou non accumuler des composés polyphénoliques. Le cytoplasme de ces cellules renferme des organites (mitochondries et plastes contenant des grains d'amidon).

C. ETUDE CYTOCHIMIQUE

L'étude cytochimique permettra d'observer une variation éventuelle de la nature cytochimique des structures fongiques et racinaires au cours des saisons.

Les résultats sont indiqués dans le tableau 17 et illustrés dans les planches XXII et XXIII.

1. Le test PATAg

Quelle que soit la saison considérée, les structures fongiques extracellulaires (mucilage, parois hyphales, ciments) et intracellulaires (glycogène) du manteau de *Cenococcum geophilum* (Planche XXII, Fig. 1, 2 et 3) réagissent au test de mise en évidence des polysaccharides. A l'automne, l'ensemble des structures du manteau externe devient très réactif au test PATAg alors qu'une réaction plus faible est observée au niveau des parois des hyphes du manteau interne. En hiver (Planche XXII, Fig. 3), la totalité du manteau fongique est riche en polysaccharides puisqu'un fort marquage a été obtenu quelque soit la zone étudiée. Les réserves cytoplasmiques fongiques de glycogène sont réactives tout au long de l'année. En hiver, le cytoplasme des hyphes est littéralement rempli de rosettes de glycogène.

Dans le réseau de Hartig, au printemps (Planche XXII, Fig. 4), une réaction négative est observée au niveau des parois fongiques. Celles des cellules corticales voisines et le ciment réagissent plus intensément. Le reste de l'année la paroi des cellules corticales voisines du réseau

de Hartig ainsi que le ciment interfacial réagissent faiblement. En revanche, le marquage des parois fongiques du réseau s'intensifie à l'automne (Planche XXII, Fig. 5) pour disparaître en hiver (Planche XXII, Fig. 6). Le glycogène cytoplasmique fongique est fortement marqué. Il est peu abondant au printemps (Planche XXII, Fig. 4) ; à l'automne, sa quantité augmente, bien que certaines hyphes du réseau n'en renferment pas (Planche XXII, Fig. 5). En hiver, les hyphes du manteau comme celles du réseau sont riches en glycogène (Planche XXII, Fig. 6).

Les parois des cellules du cortex exempt de mycélium ainsi que les jonctions cellulaires sont très réactives au printemps (Planche XXII, Fig. 7). A partir de l'automne (Planche XXII, Fig. 8) et en hiver, ce marquage disparaît. Les jonctions cellulaires du cortex et les parois des cellules endodermiques ne réagissent pas au test PATAg aux deux dernières périodes étudiées (Planche XXII, Fig. 8 et 9).

Dans le cylindre central, quelle que soit la période étudiée, les parois des cellules du péricycle et celles des vaisseaux xylémiens ne réagissent pas au test PATAg. En revanche, une réaction plus intense est observée au niveau des parois des cellules du parenchyme, des jonctions cellulaires et du liseré pariétal bordant la cavité des vaisseaux au printemps (Planche XXII, Fig. 10). Ce marquage tend à être moins intense dans les parois des cellules du parenchyme à l'automne (Planche XXII, Fig. 11) pour s'intensifier à nouveau en hiver (Planche XXII, Fig. 12).

2. Le marquage de Gomori-Swift

Le mucilage présent en surface des mycorhizes est réactif au printemps (Planche XXIII, Fig. 1) et à l'automne. En hiver, le marquage est faible (Planche XXIII, Fig. 3).

Au printemps (Planche XXIII, Fig. 1), le ciment de l'ensemble du manteau réagit faiblement au réactif de Swift. A l'automne suivant (Planche XXIII, Fig. 2), un fort marquage apparaît au niveau des parois fongiques. Le marquage du ciment reliant les hyphes du manteau fongique s'intensifie. En revanche, en hiver (Planche XXIII, Fig. 3), le marquage a tendance à diminuer dans la zone externe mais pas au niveau des parois des hyphes de la zone interne du manteau et du ciment. De plus, au printemps, le plasmalemme et le cytoplasme des hyphes du manteau sont fortement marqués. De même, de gros globules très réactifs sont visibles dans les vacuoles fongiques (Planche XXIII, Fig. 1). A l'automne, le cytoplasme fongique n'est pas réactif mais le devient légèrement en hiver.

Dans le réseau de Hartig, les parois des hyphes ne sont pas marquées au printemps (Planche XXIII, Fig. 4) alors qu'à l'automne (Planche XXIII, Fig. 5) et en hiver, un marquage plus intense est observé (Planche XXIII, Fig. 6). Les parois des cellules corticales voisines réagissent fortement en hiver et à l'automne, et ne sont plus réactives au printemps. Le ciment

		RENDZINE BRUNIFIEE								
		PRINTEMPS			*AUTOMNE*			*HIVER*		
		Calcium	Azote	Silicium	Calcium	Azote	Silicium	Calcium	Azote	Silicium
Surface de la mycorhize	Mucilage	+(+)	+(+)	traces	+	+	traces	+(+)	+(+)	traces
Manteau externe	Parois fongiques	-	+(+)	traces	+(+)	+(+)	-	-	traces	-
	Ciment	-	++	traces	+++	++(+)	-	+(+)	+(+)	-
Manteau interne	Parois fongiques	-	traces	traces	(+)	(+)	-	-	-	-
	Ciment	-	++	traces	+	+	-	+	+	traces
	Plages de polyphénols striées	++	++	traces *	++	++	traces	++	+(+)	traces
	Plages de polyphénols non striées	no	no	no	no	no	no	no	no	no
	Globules vacuolaires	++	+++	traces *	-	+(+)	traces	traces	+(+)	traces
	Granules de polyphosphates	++ **	+	-	no	no	no	++ **	-	-
Réseau de Hartig	Parois fongiques	-	traces	traces *	(+)	(+)	-	-	traces	traces
	Parois des cellules corticales	-	-	traces *	traces	traces	traces	+(+)	+(+)	- *
	Ciment	-	(+)	traces *	(+)	(+)	traces	(+)	+	traces
	Polyphénols striés vacuolaires	+(+)	+(+)	traces	+(+)	+(+)	-	++	+(+)	traces
	Polyphénols non striés vacuolaires	+(+)	+(+)	traces	no	no	no	++	+(+)	traces *
	Globules vacuolaires	-	++	traces	no	no	no	++	++	traces
	Granules de polyphosphates	no	no	no	no	no	no	no	no	no
Cortex	Parois des cellules corticales	-	+(+)	traces	traces	(+)	traces	traces	traces	-
	Jonctions cellulaires	-	-	traces	-	+	traces	+(+)	++	-
	Parois des cellules endodermiques	traces	(+)	-	-	-	-	traces	traces	traces
	Polyphénols de l'endoderme	+(+)	+(+)	traces	+	+	-	+++	++	traces
Cylindre central	Parois des cellules du péricycle	(+)	+	-	-	+(+)	traces	+	+	traces
	Polyphénols du péricycle	?	?	?	+(+)	++	-	+++	++	traces
	Parois des cellules du parenchyme	(+)	(+)	traces	traces	traces	-	+	+	-
	Polyphénols du parenchyme	+(+)	+(+)	traces	+(+)	++	-	++	+	-
	Jonctions cellulaires	+	+	-	traces	+	-	+++	+++	traces
	Parois lignifiées des vaisseaux	-	+	traces	-	-	-	+(+)	+(+)	-
	Liseré interne des parois du xylème	traces	traces	traces	-	+	-	+(+)	+(+)	traces

Tableau 18 : Localisations du calcium, de l'azote et du silicium dans les structures présentes dans les mycorhizes de *Fagus sylvatica* / *Cenococcum geophilum* prélevées dans la rendzine brunifiée au cours des saisons. * : associé à des traces d'aluminium ; ** : associé au phosphore.

est très fortement marqué au printemps et l'est moins à l'automne. En hiver, le marquage s'intensifie à nouveau. Les vacuoles des hyphes contiennent des globules comparables à ceux observés dans les hyphes du manteau au printemps (Planche XXIII, Fig. 4).

Les structures du cortex (parois des cellules corticales et endodermiques, jonctions cellulaires) sont faiblement marquées par le réactif de Swift au printemps (Planche XXIII, Fig. 7). Toutefois, un marquage plus fort est observé en hiver au niveau des parois des cellules corticales et des jonctions cellulaires (Planche XXIII, Fig. 8).

Dans le cylindre central, les parois des cellules du péricycle ne sont jamais marquées tout au long de l'année. En revanche, les structures du cylindre central (parois des cellules du parenchyme, jonctions cellulaires, parois épaisses et liseré pariétal interne des vaisseaux) sont très fortement marquées au printemps (Planche XXIII, Fig. 9) et à l'automne (Planche XXIII, Fig. 10). Le marquage s'atténue fortement en hiver.

D. ETUDE ANALYTIQUE

Le tableau 18 réunit les différentes analyses effectuées.

1. La surface des mycorhizes

Le mucilage présent en surface des mycorhizes montre une capacité à accumuler en assez grande proportion le calcium et l'azote tout au long de l'année. Toutefois, cette accumulation est plus faible à l'automne. Le silicium y est détecté à l'état de traces.

2. Le manteau

Au printemps, les structures fongiques du manteau n'accumulent pas le calcium exception faite des plages de composés polyphénoliques striées ainsi que des globules et des granules fongiques vacuolaires. En revanche, l'azote est globalement fortement détecté dans l'ensemble du manteau.

Le silicium est présent dans ces structures à l'état de traces parfois en association avec de l'aluminium comme c'est le cas dans les plages polyphénoliques striées et les globules vacuolaires. Cependant, la présence de silicium n'a pas été révélée dans les granules de polyphosphates fongiques.

A l'automne, le manteau fongique s'enrichit fortement en calcium. En effet, cet élément est particulièrement accumulé dans la zone externe du manteau, notamment dans le ciment interhyphal. L'azote est également détecté en grande proportion dans ces différentes structures

excepté dans les parois des hyphes internes et dans le ciment, où l'accumulation est plus faible. La présence de silicium est peu marquée dans le manteau fongique à cette époque de l'année. Il a été détecté uniquement dans les plages polyphénoliques ainsi que dans les globules vacuolaires. Les granules de polyphosphates n'ont pas été observés.

En hiver, les parois des hyphes du manteau n'accumulent pas, ou très peu, le calcium et l'azote. En revanche, ces deux éléments sont fortement détectés dans les ciments interhyphaux et dans les plages de composés polyphénoliques striées. Le silicium est absent des structures de la zone externe du manteau et est détecté à l'état de traces dans la zone interne. Les globules vacuolaires accumulent fortement l'azote ainsi que des traces de calcium et de silicium. Les granules de polyphosphates vacuolaires stockent le calcium.

3. Le réseau de Hartig

Au printemps, au niveau du réseau de Hartig, les parois des cellules des deux partenaires et le ciment interfacial renferment des traces de silicium et d'aluminium. En revanche, l'azote est présent en faible proportion dans les parois fongiques et le ciment mais sa présence n'a pas été révélée dans la paroi des cellules corticales voisines du réseau. Le calcium ne s'accumule pas dans ces structures, toutefois, il est présent en grande proportion dans les polyphénols vacuolaires, striés ou non, contenus dans les cellules corticales, en association avec de l'azote et du silicium. Les granules vacuolaires fongiques n'ont pas été observés.

A l'automne, le calcium et l'azote sont faiblement détectés dans les parois des cellules des deux partenaires ainsi que dans le ciment. Toutefois, leur accumulation est plus importante dans les polyphénols vacuolaires striés observés dans les cellules corticales voisines du réseau de Hartig. Le silicium est présent à l'état de traces dans les parois des cellules végétales et dans le ciment.

En hiver, les parois des cellules corticales voisines du réseau et le ciment, dans une moindre mesure, accumulent le calcium et l'azote. En revanche, les parois fongiques fixent peu les éléments puisque seules des traces d'azote et de silicium ont été détectées à ce niveau. Le silicium est également présent dans le ciment et la présence d'aluminium a été révélée dans les parois des cellules corticales voisines du réseau de Hartig. Toutefois, c'est dans les polyphénols vacuolaires des cellules corticales et dans les globules fongiques que les plus fortes proportions d'azote et de calcium ont été détectées avec des traces de silicium et/ou d'aluminium. Les granules de polyphosphates n'ont pas été observés.

4. Le cortex profond

Au printemps, le cortex est relativement pauvre en éléments. Seule la présence d'azote a été révélée dans les parois des cellules corticales ainsi que des traces de silicium. Ce dernier est également détecté dans les jonctions cellulaires alors que le calcium et l'azote en sont absents. La paroi épaissie des cellules endodermiques n'accumulent qu'un peu d'azote et de calcium. En revanche, ces deux éléments sont présents en grande proportion avec des traces de silicium dans les polyphénols contenus dans les vacuoles de ces cellules.

A l'automne, de très faibles proportions de calcium, d'azote et de silicium ont été détectées dans les parois des cellules corticales. Les jonctions cellulaires renferment un peu plus d'azote ainsi que des traces de silicium mais pas de calcium. La paroi épaissie des cellules endodermiques n'accumulent pas les éléments recherchés. En revanche, du calcium et de l'azote sont présents en faible proportion dans les polyphénols en formation qu'elles renferment.

En hiver, le cortex des mycorhizes accumule le calcium et l'azote principalement au niveau des jonctions cellulaires et des polyphénols présents dans le cortex. Les parois végétales ne renferment que des traces de calcium et d'azote. Le silicium n'a pas été détecté dans ces structures. Les composés polyphénoliques des cellules endodermiques sont riches en calcium et azote. Ils contiennent également des traces de silicium. Les parois épaissies des cellules endodermiques ne renferment que des traces de calcium, d'azote et de silicium.

5. Le cylindre central

Au printemps, le cylindre central est globalement pauvre en éléments. En effet, le calcium et l'azote sont abondamment présents dans les polyphénols du parenchyme, toutefois, ils ont été détectés, en faible proportion, dans les parois des cellules du péricycle, du parenchyme ainsi que dans les jonctions cellulaires. La paroi épaissie des vaisseaux xylémiens renferme un peu d'azote mais pas de calcium. La présence de ces deux éléments est également révélée dans le liseré pariétal interne qui borde la cavité de ces vaisseaux. Le silicium a été détecté, à l'état de traces, dans les structures citées précédemment, exception faite des parois des cellules du péricycle et des jonctions cellulaires.

Il en est de même **à l'automne**, où les parois des cellules du péricycle, du parenchyme, des vaisseaux ainsi que les jonctions cellulaires accumulent peu ou pas le calcium et l'azote. En revanche, les polyphénols des cellules du péricycle et du parenchyme médullaire stockent fortement ces éléments. La présence de silicium n'a pas été révélée dans le cylindre central excepté dans la paroi des cellules du péricycle.

Pendant **la période hivernale**, les parois des cellules du péricycle renferment du calcium, de l'azote en faible proportion et des traces de silicium. Des traces de silicium sont également observées dans les polyphénols vacuolaires des cellules du péricycle. Ces composés polyphénoliques accumulent cependant fortement le calcium et l'azote. Ces deux éléments sont stockés en abondance dans la paroi lignifiée des vaisseaux, dans les jonctions cellulaires ainsi que dans le liseré dense qui borde la cavité des vaisseaux. Ces deux dernières structures contiennent des traces de silicium. Le parenchyme du cylindre central accumule plus faiblement le calcium et l'azote dans ses parois et dans ses vacuoles.

II. LES MYCORHIZES DE *LACTARIUS SUBDULCIS*

A. ETUDES MORPHOLOGIQUE ET HISTOLOGIQUE

Pendant les périodes printanière, automnale et hivernale, les mycorhizes à *Lactarius subdulcis* représentent une faible proportion parmi les associations symbiotiques présentes dans le sol, comme cela a été observé en été.

De même, les observations histologiques menées sur ces mycorhizes sont identiques à celles effectuées en été. Ces ectomycorhizes de couleur orangée se composent d'un manteau fongique très épais, d'un réseau de Hartig continu et unisérié et d'une partie racinaire formée uniquement de tissus primaires.

B. ETUDE ULTRASTRUCTURALE

Aux trois périodes étudiées, les mycorhizes à *Lactarius subdulcis* conservent les particularités ultrastructurales observées en été c'est-à-dire un manteau divisé en un manteau externe mort et en un manteau interne vivant. Le réseau de Hartig est continu et unisérié (Planche XXIV, Fig. 1). Au printemps (Planche XXIV, Fig. 2, 3, 4 et 5) et en hiver (Planche XXIV, Fig. 9, 10 et 11), la distribution des granules de polyphosphates ainsi que des globules vacuolaires demeure inchangée puisque leur présence a été observée dans les hyphes du manteau interne et du réseau de Hartig. En revanche, à l'automne (Planche XXIV, Fig. 6, 7 et 8), des granules de polyphosphates sont observés dans le manteau mais pas dans le réseau de Hartig et inversement pour les globules riches en azote.

Tout au long de l'année, le cortex et le cylindre central des mycorhizes sont généralement vivants comme cela a été observé en été. Les cellules corticales possèdent une grosse vacuole. Leur cytoplasme est réduit et renferme des mitochondries et des amyloplastes. Les jonctions

	CONSTITUANTS	RENDZINE BRUNIFIEE					
		PRINTEMPS		*AUTOMNE*		*HIVER*	
		Polysaccharides	Protéines	Polysaccharides	Protéines	Polysaccharides	Protéines
Manteau externe	Parois fongiques	+	+	+	-	(+)	(+)
	Ciment	+	+	++	-	+	(+)
Manteau interne	Parois fongiques	+	-	++	-	(+)	+
	Ciment	+	+	++	+(+)	(+)	+++
	Glycogène	+++	-	+++	-	+++	-
Réseau de Hartig	Parois fongiques	+	+	+	-	+	-
	Parois des cellules corticales	+	+	+	-	+(+)	-
	Ciment	+	+++	+	-	+	+
	Glycogène	+++	-	+++	-	+++	-
Cortex	Parois des cellules corticales	+	(+)	-	-	-	+
	Jonctions cellulaires	++	(+)	+	-	-	-
	Parois des cellules endodermiques	-	-	-	-	-	-
Cylindre central	Parois des cellules du péricycle	++	+	+	-	+	-
	Parois des cellules du parenchyme	++	+	+(+)	(+)	+(+)	+(+)
	Jonctions cellulaires	+	-	++	-	+(+)	+(+)
	Parois lignifiées des vaisseaux	+	+	-	+	+	-
	Liseré interne des parois du xylème	++	++	+	-	++	+

Tableau 19 : Organisation et nature glycoprotéique des constituants formant les structures présentes dans les mycorhizes de *Fagus sylvatica / Lactarius subdulcis* récoltées dans la rendzine brunifiée au cours des saisons.

cellulaires présentes dans le cortex sont de taille réduite. Des amyloplastes ont également été observés dans le cytoplasme des cellules du parenchyme médullaire. Ces cellules peuvent accumuler des polyphénols dans leur vacuole. Cependant, des signes de dégénérescence (désagrégation du cytoplasme) ont été observés dans des cellules du cylindre central de rares échantillons récoltés à l'automne et en hiver.

L'Ascomycète en association avec le lactaire, bien développé pendant l'été, est moins fréquemment observé pendant le reste de l'année.

C. ETUDE CYTOCHIMIQUE

Le tableau 19 rassemble les différents résultats qui sont également illustrés dans les planches XXV et XXVI.

1. Le test PATAg

Au printemps (Planche XXV, Fig. 1), le marquage est faible au niveau des structures fongiques de l'ensemble du manteau, excepté au niveau du glycogène cytoplasmique présent dans les hyphes du manteau interne et qui est très fortement réactif. A l'automne, les parois des hyphes du manteau externe sont faiblement marquées (Planche XXV, Fig. 2), alors que celles des hyphes du manteau interne et le ciment le sont plus (Planche XXV, Fig. 3). En revanche, en hiver (Planche XXV, Fig. 4), les parois fongiques et le ciment du manteau interne ne réagissent que faiblement au test PATAg. Le latex des laticifères présents dans le manteau interne est faiblement réactif au printemps (Planche XXV, Fig. 1) et à l'automne mais pas en hiver.

Au niveau du réseau de Hartig (Planche XXV, Fig. 5, 6 et 7), les parois cellulaires des deux partenaires et le ciment qui les relie réagissent faiblement aux trois périodes étudiées.

Dans le cortex profond, les parois des cellules sont faiblement marquées au printemps (Planche XXV, Fig. 8). Ce marquage disparaît à l'automne (Planche XXV, Fig. 9) et en hiver (Planche XXV, Fig. 10). Concernant les jonctions cellulaires, elles présentent une réponse intense au test PATAg au printemps (Planche XXV, Fig. 8) et ne sont plus marquées le reste de l'année (Planche XXV, Fig. 9 et 10).

Dans le cylindre central, un fort marquage a été observé au printemps, au niveau des parois des cellules du péricycle, du parenchyme et des vaisseaux. Ce marquage tend à diminuer à l'automne (Planche XXV, Fig. 11) et en hiver (Planche XXV, Fig. 12). Les jonctions cellulaires, faiblement marquées au printemps, sont plus réactives à l'automne et en hiver.

		RENDZINE BRUNIFIEE								
		PRINTEMPS			*AUTOMNE*			*HIVER*		
		Calcium	Azote	Silicium	Calcium	Azote	Silicium	Calcium	Azote	Silicium
Surface		-	(+)	-	-	traces	-	+	-	traces
Manteau externe	Parois fongiques	traces	traces	traces	-	(+)	traces	(+)	traces	traces
	Ciment	-	+	traces	+	+	traces	traces	traces	traces
Manteau interne	Parois fongiques	(+)	(+)	traces	+	+	traces	+	+	traces
	Ciment	+	+	traces	+	+	traces	(+)	(+)	traces
	Plages de polyphénols striées	+++	+++	-	++	++	traces	++++	+++	traces
	Plages de polyphénols non striées	no	no	no	++	++	traces	+++	+++	traces
	Globules vacuolaires	+(+)	++++	-	no	no	no	+	+(+)	traces
	Granules de polyphosphates	+ **	-	-	+(+) **	traces	traces	+(+)**	-	-
Réseau de Hartig	Parois fongiques	(+)	(+)	traces	(+)	+	traces	(+)	+	-
	Parois des cellules corticales	traces	(+)	traces	(+)	+	traces	+	+	-
	Ciment	+	(+)	traces	(+)	+	-	+(+)	++	traces
	Polyphénols vacuolaires	+++	+++	-	+++	++	traces	+(+)	+(+)	traces
	Globules vacuolaires	-	++	-	-	++	-	-	+(+)	-
	Granules de polyphosphates	+(+)**	-	-	no	no	no	+	++	-
Cortex	Parois des cellules corticales	-	+	-	-	(+)	-	+	+(+)	traces
	Jonctions cellulaires	+(+)	++	traces	-	(+)	-	++	+++	traces
	Parois des cellules endodermiques	+	+	-	-	-	traces	-	-	-
	Polyphénols de l'endoderme	-	+(+)	traces	++	++	-	++	+(+)	-
Cylindre central	Parois des cellules du péricycle	-	traces	traces	traces	(+)	-	+(+)	+(+)	traces
	Polyphénols du péricycle	+(+)	+(+)	-	++	++	traces	?	?	?
	Parois des cellules du parenchyme	-	traces	traces	traces	traces	-	+	(+)	traces
	Polyphénols du parenchyme	+	++	traces	++	++	traces	-	-	traces
	Jonctions cellulaires	+(+)	+++	traces	traces	(+)	-	+(+)	+(+)	traces
	Parois lignifiées des vaisseaux	-	+	traces	-	-	-	-	-	traces
	Liseré interne des parois du xylème	+	+(+)	traces	-	(+)	traces	-	-	traces

Tableau 20 : Localisations du calcium, de l'azote et du silicium dans les structures présentes dans les mycorhizes de *Fagus sylvatica* / *Lactarius subdulcis* prélevées dans la rendzine brunifiée au cours des saisons. ** : associé au phosphore.

2. Le marquage de Gomori-Swift

Les parois fongiques et le ciment du manteau externe sont faiblement marqués au printemps et ne le sont plus à l'automne (Planche XXVI, Fig. 2). En hiver, ce marquage est très discret (Planche XXVI, Fig. 4). Le ciment du manteau interne est faiblement marqué au printemps et à l'automne (Planche XXVI, Fig. 3) et devient très réactif en hiver (Planche XXVI, Fig. 5). En revanche, les parois fongiques ne le sont pas au printemps et à l'automne. Les vacuoles fongiques renferment des gros globules très denses (Planche XXVI, Fig. 1 et 3).

Dans le réseau de Hartig, au printemps (Planche XXVI, Fig. 6), les parois cellulaires des deux partenaires sont peu réactives et ne le sont pas à l'automne (Planche XXVI, Fig. 7) et en hiver (Planche XXVI, Fig. 8). Une variation importante du marquage a été observée au niveau du ciment interfacial. En effet, cette structure est très réactive au printemps (Planche XXVI, Fig. 6), l'est plus faiblement en hiver (Planche XXVI, Fig. 8) et aucun marquage n'est observé à l'automne (Planche XXVI, Fig. 7).

Dans le cortex profond, les parois des cellules réagissent faiblement au réactif de Swift au printemps (Planche XXVI, Fig. 9) et en hiver mais pas à l'automne (Planche XXVI, Fig. 10). En revanche, au niveau des jonctions cellulaires, le faible marquage observé au printemps et en été, disparaît à partir de l'automne. Au niveau de l'endoderme, les parois cellulaires ne sont pas marquées (Planche XXVI, Fig. 11).

Au printemps (Planche XXVI, Fig. 12), les structures du cylindre central (parois cellulaires du péricycle, du parenchyme et des vaisseaux) réagissent faiblement au réactif de Swift. A l'automne (Planche XXVI, Fig. 13), le marquage devient très discret. En hiver (Planche XXVI, Fig. 14), les parois des cellules du parenchyme et les jonctions cellulaires réagissent plus fortement au réactif de Swift. Un faible marquage est également observé dans le liseré pariétal bordant la cavité des vaisseaux.

D. ETUDE ANALYTIQUE

Les analyses sont rassemblées dans le tableau 20.

1. La surface des mycorhizes

Au printemps, si le calcium et le silicium sont absents de la surface de ces mycorhizes, l'azote est présent en faible proportion. En revanche, seules des traces d'azote ont été détectées **à l'automne**. **En hiver**, du calcium et des traces de silicium sont présents à la surface des mycorhizes à *Lactarius subdulcis*.

2. Le manteau

Pendant les trois périodes étudiées, le calcium, l'azote et le silicium sont très peu accumulés dans les structures du manteau externe (parois fongiques et ciment). Le calcium semble même absent du ciment interhyphal au printemps et des parois fongiques à l'automne.

Au printemps, dans le manteau interne, les parois des hyphes et le ciment interhyphal renferment du calcium et de l'azote en faibles proportions ainsi que des traces de silicium. Toutefois, les plages de composés polyphénoliques striées accumulent abondamment le calcium et l'azote mais pas le silicium (les plages de polyphénols non striées n'ont pas été observées). De même, l'azote est fortement concentré dans les globules vacuolaires fongiques où il est associé à du calcium. Ce dernier est également présent dans les granules de polyphosphates vacuolaires fongiques.

A l'automne, les parois fongiques et le ciment contiennent également de faibles proportions de calcium, d'azote et de silicium. Toutefois, les plages polyphénoliques striées ou non accumulent fortement le calcium et l'azote et des traces de silicium. Le calcium est également stocké dans les granules de polyphosphates vacuolaires. Les globules vacuolaires riches en azote n'ont pas été observés.

Dans le manteau interne, **en hiver**, ce sont les plages de composés polyphénoliques striées ou non qui stockent la majeur partie du calcium et de l'azote. Seules des traces de silicium sont détectées dans ces structures. Les parois fongiques contiennent ces trois éléments en faibles proportions. L'analyse du ciment révèle des traces de silicium et de faibles proportions de calcium et d'azote. Le calcium est également immobilisé dans les granules de polyphosphates vacuolaires, alors que l'azote vacuolaire associé à des traces de silicium et à du calcium, est concentré sous forme de globules. Le cytoplasme des hyphes accumule le calcium et l'azote.

3. Le réseau de Hartig

Au printemps, les parois des hyphes, celles des cellules corticales voisines du réseau de Hartig et le ciment renferment de faibles proportions de calcium, d'azote et de silicium. En revanche, les polyphénols vacuolaires contenus dans les cellules corticales, accumulent fortement le calcium et l'azote. Ces éléments sont également détectés dans les globules et les granules vacuolaires observés dans les hyphes du réseau de Hartig.

A l'automne, les parois des cellules des deux partenaires et le ciment accumulent peu les éléments recherchés. Le silicium semble même absent du ciment. Les polyphénols vacuolaires contenus dans les cellules corticales voisines du réseau de Hartig contiennent du calcium et de l'azote en grande proportion ainsi que des traces de silicium. L'azote est immobilisé dans les

globules vacuolaires fongiques. Les granules de polyphosphates fongiques n'ont pas été observés.

En hiver, le calcium et l'azote sont détectés dans les parois cellulaires des deux partenaires ainsi que dans le ciment interfacial. Ils présentent toutefois une accumulation accrue dans le ciment qui contient également des traces de silicium. Dans les vacuoles fongiques, le calcium est principalement en association avec les granules de polyphosphates. L'azote est sous forme de globules. Dans les vacuoles des cellules corticales voisines du réseau de Hartig, ce sont principalement le calcium et l'azote qui sont associés aux polyphénols avec des traces de silicium.

4. Le cortex profond

Au printemps, les jonctions cellulaires situées entre les cellules corticales, accumulent du calcium, de l'azote et des traces de silicium. L'azote est également présent dans la paroi des cellules du cortex ; le calcium et le silicium n'y sont pas détectés. Dans la paroi des cellules endodermiques, le calcium et l'azote sont peu détectés. Le silicium y est absent. En revanche, des traces de cet élément ainsi que de l'azote, en assez grande proportion, sont révélées dans les composés polyphénoliques vacuolaires contenus dans ces cellules.

A l'automne, les parois des cellules corticales ainsi que les jonctions cellulaires ne renferment que de l'azote en faible proportion. Du silicium a été détecté, à l'état de traces, dans la paroi épaissie des cellules endodermiques. En revanche, le calcium et l'azote sont fortement accumulés dans les polyphénols vacuolaires contenus dans ces cellules.

Dans les échantillons récoltés **en hiver**, le calcium et l'azote sont détectés dans les jonctions cellulaires du cortex, ainsi que dans les parois des cellules corticales. Le silicium n'y est présent qu'à l'état de traces. Alors que les parois des cellules endodermiques ne contiennent pas les éléments recherchés, le calcium et l'azote sont présents dans les polyphénols vacuolaires de ces cellules.

5. Le cylindre central

Au printemps, les parois des cellules du péricycle et du parenchyme ne renferment que des traces d'azote et de silicium. Ce sont les jonctions cellulaires puis les polyphénols contenus dans les cellules du péricycle et du parenchyme, qui accumulent le plus le calcium et l'azote. La présence de ces deux éléments a également été révélée dans le liseré pariétal interne qui borde la cavité des vaisseaux. Toutefois, si l'azote est faiblement présent dans la paroi épaisse des vaisseaux xylémiens, le calcium semble en être absent. Le silicium est présent, à l'état de traces,

dans le parenchyme (parois cellulaires et polyphénols vacuolaires), dans les jonctions cellulaires ainsi que dans les vaisseaux du xylème (parois épaissies et liseré pariétal interne).

A l'automne, le calcium et l'azote sont très faiblement accumulés dans les parois des cellules du péricycle, du parenchyme médullaire et dans les jonctions cellulaires. Ces deux éléments sont toutefois fortement stockés dans les composés polyphénoliques de ces cellules associés à du silicium. Seul un peu d'azote et des traces de silicium ont été détectés au niveau des vaisseaux xylémiens dans le liseré pariétal bordant leur cavité.

En hiver, les parois des cellules du péricycle accumulent le calcium et l'azote. Elles présentent également des traces de silicium. Dans le cylindre central, le calcium et l'azote sont principalement présents dans les jonctions cellulaires. Les parois des cellules parenchymateuses en contiennent de faibles proportions et ils semblent absents des parois des vaisseaux xylémiens. Des traces de silicium sont détectées dans les parois des cellules parenchymateuses , dans les vaisseaux (parois et liseré pariétal interne), dans les polyphénols contenus dans les cellules du parenchyme et dans les jonctions cellulaires. Dans les cellules parenchymateuses, le calcium et l'azote se localisent aussi dans le cytoplasme et semblent absents des polyphénols vacuolaires que ces cellules renferment.

III. LES RACINES PORTEUSES DE MYCORHIZES DE *FAGUS SYLVATICA*

A. ETUDES MORPHOLOGIQUE ET HISTOLOGIQUE

La morphologie des racines porteuses de mycorhizes ne montre pas de modifications particulières sur le sol calcaire, que ce soit au printemps, pendant l'automne ou en hiver, comparée à celle des prélèvements estivaux.

Le cortex est dégénérescent et les cellules corticales sont envahies de mycélium. Le cylindre central volumineux renferme des tissus secondaires.

B. ETUDE ULTRASTRUCTURALE

L'étude ultrastructurale ne révèle pas de modifications particulières chez les racines porteuses de mycorhizes, à chaque période de l'année étudiée : le cortex renferme notamment des hyphes (Planche XXVII, Fig. 1, 2 et 3). La paroi de certaines hyphes apparaît très dense alors que celle d'autres hyphes est plus claire (Planche XXVII, Fig. 2). L'endoderme est identifiable aux polyphénols accumulés dans ses cellules (Planche XXVII, Fig. 4, 5 et 6). La face interne de la paroi des cellules endodermiques est généralement pourvue d'une bande sombre (Planche

	CONSTITUANTS	RENDZINE BRUNIFIEE					
		PRINTEMPS		*AUTOMNE*		*HIVER*	
		Polysaccharides	Protéines	Polysaccharides	Protéines	Polysaccharides	Protéines
Cortex	Parois des cellules corticales	(+)	+	(+)	+	+	++
	Parois des hyphes intracellulaires	(+) / ++	+	(+) / +++	+ / +++	+ / ++	+ / ++
	Jonctions cellulaires	++	+	++	+	++	++
	Parois des cellules endodermiques	-	-	-	-	-	-
Cylindre central	Parois des cellules du suber	-	-	-	-	-	-
	Parois des cellules du phellogène	-	-	-	-	-	-
	Parois des cellules du parenchyme	++	+(+)	+(+)	+(+)	+	+
	Jonctions cellulaires	++	+++	+(+)	+++	+	+
	Parois lignifiées des vaisseaux	-	ze : - ; zi : ++	-	ze : + ; zi : +(+)	-	ze : + ; zi : -
	Liseré interne des parois du xylème	++	++	++	++	++	++

Tableau 21 : Organisation et nature glycoprotéique des constituants formant les structures présentes dans les racines porteuses de mycorhizes de *Fagus sylvatica* récoltées dans la rendzine brunifiée au cours des saisons. ze : zone externe ; zi : zone interne.

XXVII, Fig. 4 et 5) excepté lorsque le cortex n'est pas encore desquamé mais est toujours en relation avec l'endoderme (Planche XXVII, Fig. 6). Le phellogène différenciant du suber est mis en place au niveau de l'assise péricyclique et les cellules se chargent en polyphénols (Planche XXVII, Fig. 5). Le cylindre central renferme également des structures secondaires (Planche XXVII, Fig. 7, 8 et 9). Les cellules du parenchyme accumulent des polyphénols en plus grande quantité en hiver (Planche XXVII, Fig. 9) qu'en automne (Planche XXVII, Fig. 8).

C. ETUDE CYTOCHIMIQUE

Les résultats sont indiqués dans le tableau 21 et dans les planches XXVIII et XXIX.

1. Le test PATAg

Quelle que soit la période étudiée, les parois des cellules corticales sont peu réactives au test PATAg (Planche XXVIII, Fig. 1 et 2). En revanche, les jonctions cellulaires du cortex montrent un fort marquage pendant toute l'année (Planche XXVIII, Fig. 1, 2). Les parois des hyphes intracellulaires sont également marquées quelle que soit la saison étudiée.

Pendant les trois périodes étudiées, les parois des cellules du suber et du phellogène ne présentent aucun marquage (Planche XXVIII, Fig. 3). Si les parois des cellules du parenchyme médullaire sont fortement marquées au printemps (Planche XXVIII, Fig. 4) et à l'automne (Planche XXVIII, Fig. 5), elles sont au contraire faiblement réactives en hiver (Planche XXVIII, Fig. 6). Le marquage intense observé au niveau des jonctions cellulaires au printemps, devient plus faible à l'automne et en hiver. La paroi épaisse des vaisseaux xylémiens n'est généralement pas réactive (Planche XXVIII, Fig. 5 et 6). En revanche, le liseré pariétal bordant leur cavité est toujours plus fortement marqué.

2. Le marquage de Gomori-Swift

Au printemps, les structures du cortex sont peu marquées (Planche XXIX, Fig. 1). A l'automne (Planche XXIX, Fig. 2), une faible réaction est observée dans les parois des cellules corticales et le marquage au niveau de certaines hyphes intracellulaires est intense. En hiver, les parois végétales et fongiques sont bien marquées et les jonctions cellulaires réagissent fortement au réactif de Swift (Planche XXIX, Fig. 3). Au niveau de l'endoderme, les jonctions cellulaires sont fortement marquées. Les composés polyphénoliques qu'elles renferment réagissent également (Planche XXIX, Fig. 4).

		RENDZINE BRUNIFIEE								
		PRINTEMPS			*AUTOMNE*			*HIVER*		
		Calcium	Azote	Silicium	Calcium	Azote	Silicium	Calcium	Azote	Silicium
Cortex	Parois des cellules corticales	-	(+)	traces	++(+)	traces	-	+(+)	+(+)	-
	Parois des hyphes intracellulaires	(+)	(+)	traces	+(+)	+(+)	traces	(+)	(+)	-
	Globules fongiques	?	?	?	no	no	no	+(+)	++	-
	Granules fongiques	?	?	?	+++ **	-	-	no	no	no
	Polyphénols	++	++	-	+	(+)	-	+(+)	+	-
	Jonctions cellulaires	-	(+)	traces	+(+)	(+)	-	+(+)	+(+)	-
	Parois des cellules endodermiques	-	(+)	traces	-	-	traces	-	-	-
	Liseré interne pariétal / endoderme	-	-	silice	-	-	silice	-	-	silice
	Polyphénols de l'endoderme	++	+(+)	traces	++(+)	+(+)	-	-	-	-
Cylindre central	Parois des cellules du suber	-	-	traces	-	-	traces	traces	traces	-
	Liseré interne pariétal / suber	-	-	silice	-	-	silice	-	-	silice
	Polyphénols du suber	no	no	no	++(+)	+(+)	traces	+	+	-
	Parois des cellules du phellogène	+(+)	+(+)	?	(+)	traces	traces	traces	traces	-
	Parois des cellules du parenchyme	+(+)	+(+)	-	-	-	-	++	++	-
	Polyphénols du parenchyme	+	+	-	+(+)	+(+)	traces	-	++(+)	-
	Jonctions cellulaires	+(+)	+(+)	-	+	+	traces	++	++	-
	Parois lignifiées des vaisseaux	-	-	-	+	+	traces	(+)	(+)	-
	Liseré interne des parois du xylème	(+)	+	-	(+)	(+)	traces	+(+)	+(+)	-

Tableau 22 : Localisations du calcium, de l'azote et du silicium dans les structures présentes dans les racines porteuses de mycorhizes de *Fagus sylvatica* prélevées dans la rendzine brunifiée au cours des saisons. ** : associé au phosphore.

Dans le cylindre central, les jonctions cellulaires sont fortement réactives au printemps (Planche XXIX, Fig. 5) et à l'automne (Planche XXIX, Fig. 6). Ce marquage s'atténue en hiver (Planche XXIX, Fig. 7). Les parois des cellules du parenchyme présentent un marquage relativement intense bien qu'il soit atténué en hiver. De plus, les parois des vaisseaux se divisent en deux couches dont l'intensité de la réaction varie. La couche externe, peu épaisse, ne présente aucun marquage au printemps et devient peu réactive le reste de l'année. La couche interne, épaisse, montre la réaction inverse.

C. ETUDE ANALYTIQUE

Les analyses sont indiquées dans le tableau 22.

1. Le cortex

Au printemps, le calcium semble absent des parois des cellules corticales, des cellules endodermiques et des jonctions cellulaires. Toutefois, une légère accumulation a été observée dans la paroi des hyphes intracellulaires. De plus, il est présent dans les composés polyphénoliques stockés dans les cellules corticales et les cellules de l'endoderme. L'azote est également détecté dans ces polyphénols. Sa présence a aussi été révélée, en plus faible proportion, dans les parois des cellules corticales et endodermiques, dans celles des hyphes intracellulaires ainsi que dans les jonctions cellulaires. La présence de silicium a été principalement révélée au niveau de la paroi interne des cellules endodermiques où il est sous forme d'une bande dense de silice. Cependant, des traces ont également été détectées dans la paroi des cellules corticales, des hyphes intracellulaires et dans les jonctions cellulaires. La présence d'aluminium n'a pas été révélée dans les structures du cortex de ces racines prélevées au printemps.

A l'automne, le calcium est fortement accumulé dans les parois des cellules corticales, dans les jonctions cellulaires et dans les parois des hyphes intracellulaires. La paroi sombre de ces hyphes permet de supposer qu'il s'agit d'un Ascomycète. Les polyphénols présents dans le cortex en contiennent peu. Des granules de polyphosphates ont été observés et concentrent le calcium. En revanche, l'azote est peu accumulé dans ces structures exception faite de la paroi des hyphes intracellulaires qui en renferme plus avec des traces de silicium. Au niveau de l'endoderme, le calcium et l'azote sont intensément stockés dans les composés polyphénoliques, alors qu'ils sont absents des parois cellulaires. Une bande de silice similaire à celle observée au printemps et en été, est présente.

En hiver, les parois végétales et les jonctions cellulaires accumulent le calcium et l'azote. Les polyphénols en fixent également. Les parois des hyphes intracellulaires qui ont envahi le cortex stockent peu le calcium et l'azote. Toutefois, les globules vacuolaires fongiques accumulent ces deux éléments. Les différentes structures extracellulaires et intracellulaires formant le cortex, semblent dépourvues de toute trace de silicium. Les éléments recherchés ne sont pas détectés au niveau de l'endoderme (parois cellulaires, polyphénols vacuolaires), exception faite d'une bande de silice observée contre la paroi interne des cellules endodermiques.

2. Le cylindre central

Au printemps, les parois des cellules du suber renferment des traces de silicium mais pas de calcium ni d'azote. De plus, le liseré pariétal interne de ces cellules est souligné par une bande dense de silice. Le calcium et l'azote ont été détectés dans les parois des cellules du phellogène, du parenchyme, dans les jonctions cellulaires et, en plus faible proportion, dans le liseré pariétal qui borde la cavité des vaisseaux xylémiens. Le silicium semble absent du reste du cylindre central. Les polyphénols contenus dans les cellules parenchymateuses accumulent peu le calcium et l'azote.

A l'automne, les parois des cellules du suber renferment des traces de silicium. Toutefois, le liseré pariétal interne est souligné par une bande de silice. Les polyphénols contenus dans ces cellules, accumulent fortement le calcium et l'azote ainsi que des traces de silicium. Ces trois éléments sont peu présents dans les parois des cellules du phellogène et semblent absents de celles des cellules du parenchyme. En revanche, les polyphénols de ces cellules stockent le calcium, l'azote et des traces de silicium. Les jonctions cellulaires contiennent de faibles proportions des éléments recherchés. Il en est de même des vaisseaux xylémiens.

En hiver, au niveau du suber, le calcium et l'azote présentent une localisation peu marquée dans les parois des cellules et les polyphénols vacuolaires qu'elles renferment. Ces cellules présentent la particularité de posséder une bande de silice située contre leur paroi interne, comparable à celle observée dans l'endoderme. Dans le cylindre central, les parois des cellules du phellogène ne renferment que des traces de calcium et d'azote. En revanche, une accumulation plus importante de ces deux éléments a été observée dans les parois des cellules du parenchyme, dans les jonctions cellulaires ainsi qu'au niveau des vaisseaux xylémiens (liseré dense bordant la cavité des vaisseaux). Les composés polyphénoliques contenus dans les cellules parenchymateuses accumulent fortement l'azote mais pas le calcium. Les différentes structures du cylindre central semblent dépourvues de silicium et d'aluminium.

Chapitre III.2 : SUR LE SOL PODZOLIQUE

I. LES MYCORHIZES DE *CENOCOCCUM GEOPHILUM*

A. ETUDES MORPHOLOGIQUE ET HISTOLOGIQUE

En hiver comme au printemps et à l'automne, les mycorhizes à *Cenococcum geophilum* se sont révélées peu abondantes et elles ne constituent pas le type dominant. Leur morphologie est similaire à celle observée en juillet : ce sont des mycorhizes de petite taille (2 mm en moyenne), peu ou pas ramifiées, de couleur noir charbon avec un mycélium extramatriciel qui est néanmoins plus abondant qu'au niveau des mycorhizes récoltées dans la rendzine.

Le manteau fongique est recouvert d'un mucilage sombre. Toutefois, si un réseau de Hartig unisérié et continu est présent dans les échantillons récoltés en hiver (Planche XXX, Fig. 1), des hyphes intracellulaires sont observées dans les cellules corticales localisées sous le manteau dans les mycorhizes prélevées au printemps (Planche XXX, Fig. 2) et à l'automne (Planche XXX, Fig. 3).

En hiver, le cortex et le cylindre central de certains échantillons peuvent renfermer des hyphes intracellulaires.

B. ETUDE ULTRASTRUCTURALE

Au printemps, si l'ultrastructure du manteau fongique ne varie pas (Planche XXX, Fig. 4), le réseau de Hartig n'est pas visible. Des hyphes intracellulaires sont observées dans les cellules corticales situées sous le manteau. A cette époque de l'année, que ce soit dans les hyphes constituant le manteau (Planche XXX, Fig. 4) ou les hyphes intracellulaires (Planche XXX, Fig. 5), les globules vacuolaires ont été observés mais les granules sont absents.

A l'automne, des hyphes intracellulaires sont également observées dans les cellules corticales au contact du manteau fongique. De plus, si les globules vacuolaires sont observés dans les hyphes intracellulaires et dans celles du manteau, les granules de polyphosphates vacuolaires sont présents uniquement dans les hyphes intracellulaires (Planche XXX, Fig. 6).

En hiver, le manteau est vivant (Planche XXX, Fig. 7) et des globules sont observés dans les vacuoles des hyphes (Planche XXX, Fig. 7a). Les hyphes composant le réseau de Hartig sont de petite taille et peu vacuolisées (Planche XXX, Fig. 8) et présentent des globules volumineux (Planche XXX, Fig. 9) ainsi que des petits granules sphériques sombres. Ces derniers n'ayant pas été observés dans les mycorhizes récoltées au mois de juillet dans ces structures. Dans le cortex,

	CONSTITUANTS	SOL PODZOLIQUE					
		PRINTEMPS		*AUTOMNE*		*HIVER*	
		Polysaccharides	Protéines	Polysaccharides	Protéines	Polysaccharides	Protéines
Surface	Mucilage	+	++	++	+	++	+
Manteau externe	Parois fongiques	++	+	++	-	++	+(+)
	Ciment	-	++	++	+++	++	+
Manteau interne	Parois fongiques	(+)	+	+(+)	-	+++	++
	Ciment	++	++	++	++	+++	+++
	Glycogène	+++	-	+++	-	+++	-
Réseau de Hartig *ou* Hyphes intracellulaires	Parois fongiques	+	++	+(+)	-	+	+
	Parois des cellules corticales	+	++	+	-	+	+
	Ciment	/	/	/	/	(+)	++
	Glycogène	+++	-	+++	-	+++	-
Cortex	Parois des cellules corticales	(+)	+(+)	(+)	-	(+)	+++
	Jonctions cellulaires	(+)	+(+)	(+)	-	(+)	+++
	Parois des cellules endodermiques	-	+	-	-	-	-
Cylindre central	Parois des cellules du péricycle	+	+	-	-	-	-
	Parois des cellules du parenchyme	++	++	+	+	+	+
	Jonctions cellulaires	-	++	+	++	+	+
	Parois lignifiées des vaisseaux	-	++	-	+	-	-
	Liseré interne des parois du xylème	++	+++	+(+)	++	+	++

Tableau 23 : Organisation et nature glycoprotéique des constituants formant les structures présentes dans les mycorizes de *Fagus sylvatica* / *Cenococcum geophilum* prélevées dans le sol podzolique au cours des saisons.

en hiver, les parois des cellules corticales produisent des composés polyphénoliques (Planche XXX, Fig. 10) et le cylindre central (Planche XXX, Fig. 11) ne renferme généralement pas d'hyphes.

C. ETUDE CYTOCHIMIQUE

Le tableau 23 rassemble les différents résultats lesquels sont également illustrés dans les planches XXXI et XXXII.

1. Le test PATAg

Globalement, les structures du manteau fongique des mycorhizes à *Cenococcum geophilum* réagissent positivement et de manière similaire au test PATAg, au printemps, à l'automne et en hiver (Planche XXXI, Fig. 1, 2 et 3). Toutefois, quelques différences sont à noter. Le mucilage de surface est plus réactif à l'automne et en hiver qu'au printemps. De plus, le ciment interhyphal du manteau externe qui réagit fortement à l'automne et en hiver, ne présente plus aucun marquage au printemps. Dans le manteau interne, le marquage des parois fongiques est faible au printemps (Planche XXXI, Fig. 1), il s'intensifie à l'automne (Planche XXXI, Fig. 2) et en hiver (Planche XXXI, Fig. 3). Le glycogène cytoplasmique présent dans les hyphes montre un intense marquage. En hiver, les rosettes de glycogène sont très abondantes alors qu'au printemps leur nombre est très réduit. Le ciment du manteau interne est fortement marqué tout au long de l'année. Toutefois, le marquage est plus intense en hiver.

Au printemps (Planche XXXI, Fig. 4) et à l'automne (Planche XXXI, Fig. 5), le réseau de Hartig n'est pas visible, mais des hyphes intracellulaires sont observées. A ces deux époques de l'année, les parois des cellules des deux partenaires réagissent positivement au test PATAg. Toutefois, les parois fongiques sont plus réactives à l'automne qu'au printemps. En hiver (Planche XXXI, Fig. 6), le champignon forme un réseau de Hartig unisérié. Les parois fongiques ne sont pas marquées alors que le ciment interfacial l'est faiblement. En revanche, les parois des cellules corticales sont plus marquées.

Dans le cortex, les jonctions cellulaires sont faiblement marquées au printemps (Planche XXXI, Fig. 7), à l'automne (Planche XXXI, Fig. 8) et en hiver (Planche XXXI, Fig. 9). Il en est de même des parois des cellules corticales. En revanche, les parois des cellules endodermiques ne réagissent pas à ce test, aux trois périodes étudiées.

Dans le cylindre central, les parois des cellules du péricycle montrent une faible réponse au test PATAg au printemps, et ne sont pas marquées le reste de l'année. Au niveau des parois des

cellules du parenchyme, l'intensité du marquage varie. En effet, le fort marquage obtenu au printemps, s'atténue à l'automne (Planche XXXI, Fig. 10) et en hiver (Planche XXXI, Fig. 11). Les jonctions cellulaires réagissent faiblement à l'automne et en hiver. Quant aux vaisseaux, aucun marquage n'est observé au niveau de leur paroi épaissie quelle que soit la période considérée. En revanche, le liseré pariétal bordant leur cavité montre en général une plus forte réactivité.

2. Le marquage de Gomori-Swift

Le marquage des structures fongiques du manteau varie en fonction de la saison considérée. Au printemps, une réaction forte est observée au niveau du mucilage et des ciments du manteau alors que les parois fongiques ne réagissent que faiblement (Planche XXXII, Fig. 1). A l'automne (Planche XXXII, Fig. 2), les ciments sont également très fortement réactifs alors que les parois des hyphes ne le sont pas et que le cytoplasme fongique est marqué. En hiver (Planche XXXII, Fig. 3), un marquage est observé au niveau des parois fongiques. Le ciment est toujours très réactif dans la zone interne du manteau.

Concernant les hyphes intracellulaires, les parois sont très réactives au printemps (Planche XXXII, Fig. 4). Par contre, aucun marquage n'est observé à l'automne (Planche XXXII, Fig. 5) et une réaction positive réapparaît en hiver au niveau des parois des hyphes du réseau de Hartig (Planche XXXII, Fig. 6). Les parois des cellules corticales sont réactives au printemps et en hiver mais pas à l'automne. En hiver, le ciment reliant les deux partenaires est fortement marqué.

Dans le cortex profond, les parois des cellules corticales et les jonctions cellulaires réagissent assez fortement au printemps (Planche XXXII, Fig. 7). En revanche, aucun marquage de la lamelle moyenne et des jonctions cellulaires n'est observé à l'automne (Planche XXXII, Fig. 8). En hiver (Planche XXXII, Fig. 9), la réaction est très intense. Au niveau de l'endoderme, généralement non réactif, un faible marquage printanier apparaît dans les parois épaisses des cellules.

Dans le cylindre central, les parois des cellules du péricycle sont faiblement marquées au printemps et ne sont pas réactives le reste de l'année. Dans les parois cellulaires du parenchyme, dans les jonctions cellulaires, les vaisseaux (paroi épaisse et liseré pariétal interne), le marquage est intense au printemps (Planche XXXII, Fig. 10). A l'automne et en hiver (Planche XXXII, Fig. 11), la réactivité de ces structures s'atténue.

		SOL PODZOLIQUE								
		PRINTEMPS			*AUTOMNE*			*HIVER*		
		Calcium	Azote	Silicium	Calcium	Azote	Silicium	Calcium	Azote	Silicium
Surface de la mycorhize	Mucilage	traces	traces	traces	++	++(+)	traces	+	+	traces
Manteau externe	Parois fongiques	-	traces	-	traces	traces	traces	-	(+)	traces
	Ciment	-	+	traces	-	-	traces	-	+	-
Manteau interne	Parois fongiques	-	-	traces *	-	traces	-	traces	+	traces
	Ciment	+(+)	+(+)	traces *	traces	(+)	traces	-	+	-
	Plages de polyphénols striées	+++	+++	traces	+(+)	+	-	+	+	-
	Plages de polyphénols non striées	++	++	-	+	+	-	+	(+)	-
	Globules vacuolaires	-	+++	traces *	+	+(+)	traces	(+)	+	-
	Granules de polyphosphates	no	no	no	no	no	no	+++**	-	-
Réseau de Hartig *ou* Hyphes intracellulaires	Parois fongiques	-	(+)	traces	traces	(+)	traces	-	(+)	traces
	Parois des cellules corticales	-	+	traces *	+(+)	+(+)	traces	-	-	traces
	Ciment	/	/	/	/	/	/	+	+(+)	traces
	Polyphénols striés vacuolaires	+++	+++	-	++	+(+)	traces	++	++	-
	Polyphénols non striés vacuolaires	+(+)	+(+)	traces	-	+	-	+(+)	+(+)	traces
	Globules vacuolaires	+	++	traces	-	(+)	-	-	+(+)	traces
	Granules de polyphosphates	no	no	no	+(+) **	-	-	+++**	-	-
Cortex	Parois des cellules corticales	+	+(+)	-	-	+	traces	-	-	traces
	Jonctions cellulaires	+++	+++	traces	-	+	traces	+	+(+)	traces
	Parois des cellules endodermiques	+	+(+)	traces	-	(+)	traces	-	(+)	traces
	Polyphénols de l'endoderme	+++	+++	traces *	+(+)	+(+)	traces	+	+	traces
Cylindre central	Parois des cellules du péricycle	+	+	-	-	+	traces	-	+	traces
	Polyphénols du péricycle	no	no	no	+	+(+)	traces	++	++	traces
	Parois des cellules du parenchyme	++	++	traces	-	+(+)	traces	-	+	traces
	Polyphénols du parenchyme	+++	+++	traces	(+)	+(+)	traces	+++	++++	traces
	Jonctions cellulaires	+++	+++	traces	+	+(+)	traces	-	+	traces
	Parois lignifiées des vaisseaux	+	+	-	-	+	traces	-	-	traces
	Liseré interne des parois du xylème	+(+)	+(+)	traces *	-	++	traces	-	(+)	traces

Tableau 24 : Localisations du calcium, de l'azote et du silicium dans les structures présentes dans les mycorhizes de *Fagus sylvatica* / *Cenococcum geophilum* prélevées dans le sol podzolique au cours des saisons. * : associé à des traces d'aluminium ; ** : associé au phosphore.

D. ETUDE ANALYTIQUE

Les différentes analyses sont rassemblées dans le tableau 24.

1. La surface des mycorhizes

Quelle que soit la période étudiée, le calcium, l'azote et le silicium sont présents dans le mucilage recouvrant la surface des mycorhizes. Toutefois, l'accumulation de ces éléments est beaucoup plus importante à l'automne.

2. Le manteau

Au printemps, dans les parois fongiques et le ciment du manteau externe, seul l'azote a été détecté. Le silicium est détecté dans le ciment interhyphal au printemps. Dans la zone interne du manteau, le calcium et l'azote semblent absents des parois fongiques. Par contre, ils sont accumulés dans le ciment interhyphal. De même, dans ces structures, des traces de silicium et d'aluminium ont été détectées. Les plages de composés polyphénoliques striées accumulent fortement le calcium et l'azote ainsi que des traces de silicium. Les plages de polyphénols non striées renferment moins de calcium et d'azote et pas de silicium. L'azote se concentre également dans les globules vacuolaires fongiques, en association avec des traces de silicium et d'aluminium.

A l'automne, les éléments recherchés sont présents à l'état de traces dans les parois des hyphes externes. En revanche, seul le silicium a été détecté dans le ciment interhyphal. Dans la zone interne du manteau, le calcium est faiblement accumulé exception faite des parois fongiques où il est absent et des plages polyphénoliques striées où l'accumulation de calcium est plus intense. L'azote est présent dans ces différentes structures ainsi que dans les globules vacuolaires en association avec du silicium et du calcium. Le ciment interhyphal accumule également du silicium.

Dans le manteau interne des mycorhizes prélevées **en hiver**, le calcium est principalement stocké dans les granules de polyphosphates vacuolaires. Une faible accumulation de calcium a également été observée dans les plages de polyphénols striées ou non et dans les parois fongiques. Cet élément peut aussi être associé en faible proportion à l'azote dans les globules vacuolaires. L'azote présente une répartition plus large. Une faible accumulation a été observée dans les parois fongiques, le ciment interhyphal et les plages de polyphénols striées ou non. Le silicium semble absent de l'ensemble du manteau interne, exception faite des parois fongiques.

3. Le réseau de Hartig et les hyphes intracellulaires

Au printemps, l'azote et le silicium sont présents en faible proportion dans les parois des cellules des deux partenaires. Le calcium est absent de ces parois. De l'aluminium a été détecté uniquement dans les parois des cellules corticales. Ce sont majoritairement les composés polyphénoliques vacuolaires striés contenus dans les cellules corticales qui accumulent le calcium et l'azote. Les polyphénols non striés parfois observés dans ces cellules renferment également du calcium et de l'azote (mais dans une proportion moins importante) ainsi que des traces de silicium. Les globules fongiques vacuolaires contiennent de l'azote en assez grande proportion ainsi que du calcium et des traces de silicium.

A l'automne, le calcium et l'azote sont peu accumulés dans les structures fongiques du réseau de Hartig. En effet, les parois des hyphes contiennent un peu d'azote et des traces de calcium et de silicium. Les globules vacuolaires fongiques renferment de l'azote et les granules de polyphosphates concentrent le calcium. En revanche, les parois des cellules corticales voisines du réseau de Hartig ainsi que les polyphénols qu'elles contiennent stockent le calcium et l'azote en assez grande proportion avec des traces de silicium.

En hiver, le calcium, l'azote et le silicium sont présents dans le ciment situé entre les cellules des deux partenaires. Alors que les parois végétales sont dépourvues de calcium et d'azote mais renferment des traces de silicium, les parois fongiques contiennent une faible proportion d'azote et de silicium. Dans les cellules végétales voisines du réseau de Hartig, le calcium et l'azote sont accumulés en grande proportion dans les composés polyphénoliques vacuolaires striés ou non. Des traces de silicium ont été détectées dans les polyphénols vacuolaires non striés contenus dans ces cellules. Les globules vacuolaires fongiques renferment des traces de silicium associées à de l'azote. Les granules de polyphosphates vacuolaires stockent la majeur partie du calcium mais pas d'azote ni de silicium.

4. Le cortex profond

Au printemps, les différentes structures du cortex sont riches en calcium et en azote. En effet, les jonctions cellulaires localisées entre les cellules corticales stockent très fortement ces deux éléments. Toutefois, les parois des cellules du cortex en contiennent également mais en plus faible proportion. Du silicium a été détecté dans les jonctions cellulaires. Au niveau de l'endoderme, les parois épaissies des cellules renferment de l'azote ainsi que du calcium et du silicium. Cependant, ce sont les composés polyphénoliques des cellules endodermiques, qui accumulent fortement le calcium et l'azote. Dans ces polyphénols, des traces de silicium et d'aluminium ont également été détectées.

A l'automne, les différentes structures du cortex (parois des cellules corticales et endodermiques, jonctions cellulaires) renferment une faible proportion d'azote et des traces de silicium mais pas de calcium. Seuls les polyphénols vacuolaires présents dans les cellules endodermiques accumulent plus fortement le calcium et l'azote.

Globalement, **en hiver**, le cortex est pauvre en éléments. En effet, les parois des cellules végétales ne renferment que des traces de silicium et les jonctions cellulaires n'accumulent que faiblement le calcium et des traces de silicium, mais stockent un peu plus l'azote. Le calcium, l'azote et le silicium ont été détectés dans les composés polyphénoliques vacuolaires contenus dans les cellules endodermiques. Par contre, les parois épaisses de ces cellules ne contiennent que de faibles proportions d'azote et de silicium.

5. Le cylindre central

Au printemps, globalement, les différentes structures du cylindre central accumulent fortement le calcium et l'azote. En effet, si les parois des cellules du péricycle renferment une faible proportion de calcium et d'azote, ces deux éléments sont détectés en forte proportion dans les jonctions cellulaires ainsi que dans les parois des cellules du parenchyme. Les polyphénols contenus dans les vacuoles des cellules parenchymateuses accumulent également très fortement le calcium et l'azote. Les parois épaissies des vaisseaux renferment peu de calcium et d'azote. Cependant, ces deux éléments sont présents en assez grande proportion dans le liseré pariétal bordant la cavité des vaisseaux. Le silicium a été détecté, à l'état de traces, dans les différentes structures énoncées exception faite des parois des cellules du péricycle et des vaisseaux. Il est parfois associé à de l'aluminium comme c'est le cas dans le liseré pariétal qui borde la cavité des vaisseaux.

A l'automne, le calcium est faiblement stocké dans les jonctions cellulaires et dans les polyphénols vacuolaires contenus dans les cellules du péricycle et du parenchyme médullaire. Il n'est pas accumulé dans le reste du cylindre central. En revanche, l'azote est présent en proportion relativement forte dans l'ensemble du cylindre central. Toutefois, cette accumulation est plus faible dans la paroi des cellules du péricycle et des vaisseaux xylémiens. Le silicium est détecté à l'état de traces dans l'ensemble du cylindre central.

En hiver, dans le péricycle, les polyphénols vacuolaires accumulent en grande proportion le calcium et l'azote. Le silicium n'y est présent qu'à l'état de traces. En revanche, les parois de ces cellules stockent faiblement l'azote et le silicium. Le calcium semble absent du reste du cylindre central (paroi des cellules du parenchyme, jonctions cellulaires et vaisseaux xylémiens) excepté dans les polyphénols des cellules parenchymateuses où il est très fortement accumulé

avec de l'azote. En revanche, la présence peu marquée de l'azote a été observée dans le liseré interne des parois des vaisseaux ainsi que dans les jonctions cellulaires et les parois des cellules du péricycle et du parenchyme. La distribution du silicium se situe dans les parois des cellules du parenchyme et dans les polyphénols vacuolaires qu'elles contiennent, dans les jonctions et dans la paroi des vaisseaux xylémiens en y incluant le liseré sombre bordant leur cavité.

II. LES MYCORHIZES DE *LACTARIUS SUBDULCIS*

A. ETUDES MORPHOLOGIQUE ET HISTOLOGIQUE

Les mycorhizes à *Lactarius subdulcis* constituent le type mycorhizien dominant dans le sol podzolique tout au long de l'année.

Leur morphologie ne varie pas par rapport à celle observée pendant l'été et répond aux critères énoncés dans le chapitre II. Elles sont de couleur jaune clair quand elles sont jeunes et plus orangées lorsqu'elles sont matures. Ce sont des mycorhizes qui sont toujours très ramifiées et dont la taille peut être supérieure au cm.

A chaque prélèvement, elles montrent un manteau fongique épais et un réseau de Hartig continu et unisérié. Cependant, en hiver, contrairement a ce qui a été observé en été, du mycélium est parfois visible dans les cellules parenchymateuses du cylindre central.

B. ETUDE ULTRASTRUCTURALE

Globalement pendant les périodes printanière, automnale et hivernale, l'organisation des mycorhizes à *Lactarius subdulcis* varie peu avec celle décrite au mois de juillet (Planche XXXIII, Fig. 1). Des dépôts pouvant être cristallins sur la surface de ces organes sont observés (Planche XXXIII, Fig. 2). De plus, alors que des granules de polyphosphates (Planche XXXIII, Fig.3) et des globules riches en azote (Planche XXXIII, Fig. 4) sont observés dans les vacuoles des hyphes du manteau au printemps comme en été, la disparition des granules de polyphosphates a pu être constatée en hiver et à l'automne. Dans le réseau de Hartig, les granules de polyphosphates (Planche XXXIII, Fig. 5) et les globules fongiques vacuolaires (Planche XXXIII, Fig. 6) sont présents en hiver. Au printemps et à l'automne, les granules de polyphosphates et les globules riches en azote semblent absents de ces hyphes.

	CONSTITUANTS	SOL PODZOLIQUE					
		PRINTEMPS		*AUTOMNE*		*HIVER*	
		Polysaccharides	Protéines	Polysaccharides	Protéines	Polysaccharides	Protéines
Manteau externe	Parois fongiques	++	+	+	-	+	-
	Ciment	++	-	+	-	+	++
Manteau interne	Parois fongiques	++	++	+	-	+	-
	Ciment	++	-	++	-	-	+++
	Glycogène	+++	-	+++	-	+++	-
Réseau de Hartig	Parois fongiques	++	+	++	-	++	+++
	Parois des cellules corticales	+	+	++	+++	-	+++
	Ciment	++	+	+(+)	+++	-	-
	Glycogène	+++	-	+++	-	+++	-
Cortex	Parois des cellules corticales	+	(+)	+(+)	++	+(+)	++
	Jonctions cellulaires	+	++	+(+)	+++	+	+++
	Parois des cellules endodermiques	-	(+)	-	-	-	+
Cylindre central	Parois des cellules du péricycle	++	+	+	?	+	+
	Parois des cellules du parenchyme	+(+)	++	+(+)	+++	+	+++
	Jonctions cellulaires	+(+)	++	+(+)	+++	+	+++
	Parois lignifiées des vaisseaux	+	+	+	++	+	++
	Liseré interne des parois du xylème	++	++	++	+++	+	+++

Tableau 25 : Organisation et nature glycoprotéique des constituants formant les structures présentes dans les mycorhizes de *Fagus sylvatica* / *Lactarius subdulcis* prélevées dans le sol podzolique au cours des saisons.

C. ETUDE CYTOCHIMIQUE

Le tableau 25 et les planches XXXIV et XXXV regroupent les résultats.

1. Le test PATAg

Les différentes structures fongiques et racinaires du manteau fongique (Planche XXXIV, Fig. 1, 2 et 3) et du réseau de Hartig (Planche XXXIV, Fig. 4, 5 et 6) réagissent positivement au test PATAg, aux trois périodes étudiées mais avec des intensités différentes. Toutefois, le marquage est globalement faible en hiver (Planche XXXIV, Fig. 3 et 6) alors qu'un marquage plus intense est observé à l'automne et au printemps (Planche XXXIV, Fig. 1 et 4). Le glycogène cytoplasmique fongique est fortement marqué.

Dans le cortex, les parois des cellules et les jonctions cellulaires réagissent faiblement au test PATAg au printemps. Le marquage s'intensifie à l'automne (Planche XXXIV, Fig. 8) et en hiver (Planche XXXIV, Fig. 9). En revanche, les parois des cellules endodermiques ne sont pas marquées aux trois époques (Planche XXXIV, Fig. 7).

Dans le cylindre central, la paroi épaissie des vaisseaux xylémiens est généralement peu marquée tout au long de l'année (Planche XXXIV, Fig. 10 et 11). Les parois des cellules du péricycle et du parenchyme ainsi que les jonctions cellulaires sont réactives au printemps et le sont moins à l'automne et en hiver.

2. Le marquage de Gomori-Swift

Au printemps, seules les parois des hyphes du manteau réagissent au réactif de Swift. Elles ne montrent en revanche aucun marquage à l'automne (Planche XXXV, Fig. 1 et 2) et en hiver (Planche XXXV, Fig. 3 et 4) alors que le ciment interhyphal est fortement marqué en hiver mais pas à l'automne ni au printemps. Le glycogène cytoplasmique fongique répond généralement négativement au réactif de Swift. Il apparaît au niveau de petites vésicules blanches.

Au niveau du réseau de Hartig, les hyphes, les cellules corticales voisines et le ciment réagissent faiblement au printemps. En revanche, à l'automne (Planche XXXV, Fig. 5), le ciment et les parois des cellules corticales sont fortement marquées, alors que les parois des hyphes ne le sont pas. En hiver, les parois hyphales deviennent très réactives alors que le ciment ne l'est plus (Planche XXXV, Fig. 6).

Dans le cortex profond (Planche XXXV, Fig. 7 et 8), les jonctions cellulaires sont fortement marquées tout au long de l'année. De plus, un marquage intense est observé à l'automne (Planche XXXV, Fig. 7) et en hiver (Planche XXXV, Fig. 8) dans les parois des

		SOL PODZOLIQUE								
		PRINTEMPS			*AUTOMNE*			*HIVER*		
		Calcium	Azote	Silicium	Calcium	Azote	Silicium	Calcium	Azote	Silicium
Surface		traces	traces	traces	+(+)	++	-	-	+	traces
Manteau externe	Parois fongiques	+(+)	+	traces	(+)	+	-	(+)	traces	traces
	Ciment	+(+)	+	traces	+(+)	++	traces	traces	traces	traces
Manteau interne	Parois fongiques	(+)	+	traces	traces	(+)	-	+(+)	+(+)	traces
	Ciment	++	++	traces	-	++	traces	++	++	traces
	Plages de polyphénols striées	+++	+++	-	+(+)	+(+)	traces	+(+)	+	traces
	Plages de polyphénols non striées	no	no	no	no	no	no	+++	+++	traces
	Globules vacuolaires	+	++	-	-	+(+)	-	+	++	traces
	Granules de polyphosphates	+ **	-	-	no	no	no	no	no	no
Réseau de Hartig	Parois fongiques	(+)	(+)	traces	traces	+	-	(+)	(+)	traces
	Parois des cellules corticales	(+)	(+)	traces	traces	+	-	traces	traces	traces
	Ciment	(+)	(+)	traces	+	+(+)	-	+++	+++	traces
	Polyphénols vacuolaires	+++	+++	-	+	+(+)	-	++	++	-
	Globules vacuolaires	no	no	no	no	no	no	-	++	-
	Granules de polyphosphates	no	no	no	no	no	no	++**	-	-
Cortex	Parois des cellules corticales	+(+)	+(+)	traces	(+)	+	traces	+	+	traces
	Jonctions cellulaires	+++	+++	traces	-	++	traces	(+)	++	-
	Parois des cellules endodermiques	++	++	traces	-	+(+)	-	-	+	traces
	Polyphénols de l'endoderme	+++	+++	traces	/	/	/	++	+(+)	traces *
Cylindre central	Parois des cellules du péricycle	+	+	-	-	+(+)	traces	-	traces	traces
	Polyphénols du péricycle	+++	+++	-	++	++	-	no	no	no
	Parois des cellules du parenchyme	+(+)	+(+)	traces	+(+)	+(+)	traces	(+)	(+)	traces
	Polyphénols du parenchyme	+++(+)	+++(+)	traces	++	++(+)	-	+(+)	+(+)	traces
	Jonctions cellulaires	++	++(+)	traces	+(+)	++	-	(+)	+	traces
	Parois lignifiées des vaisseaux	-	(+)	traces	-	+(+)	-	-	-	traces
	Liseré interne des parois du xylème	-	+	traces **	+	+	traces	-	(+)	traces

Tableau 26 : Localisations du calcium, de l'azote et du silicium dans les structures présentes dans les mycorhizes de *Fagus sylvatica* / *Lactarius subdulcis* prélevées dans le sol podzolique au cours des saisons. * : associé à des traces d'aluminium ; ** : associé au phosphore.

cellules corticales. Les parois des cellules endodermiques sont peu réactives au printemps et en hiver mais ne le sont pas à l'automne.

Les différentes structures (parois cellulaires, jonctions cellulaires) du cylindre central réagissent fortement au réactif de Swift au printemps, à l'automne (Planche XXXV, Fig. 9) et en hiver (Planche XXXV, Fig. 10).

D. ETUDE ANALYTIQUE

Le tableau 26 regroupe les analyses effectuées.

1. La surface des mycorhizes

Si en hiver, seuls l'azote et le silicium sont détectés dans la couche pariétale la plus externe, au printemps ces deux éléments ainsi que le calcium sont présents à l'état de traces. En revanche, à l'automne, le calcium et l'azote sont fortement accumulés dans ces structures de surface alors que la présence de silicium n'a pas été révélée.

2. Le manteau

Au printemps, l'azote et surtout le calcium sont accumulés dans les parois des hyphes du manteau externe ainsi que dans le ciment. Ces structures renferment également des traces de silicium. Dans le manteau interne, si le silicium est détecté également à l'état de traces dans les parois fongiques, le calcium et l'azote sont présents en plus forte proportion. En revanche, le ciment interhyphal et les plages de composés polyphénoliques striées accumulent fortement ces deux éléments. Les globules vacuolaires observés dans les hyphes stockent le calcium et l'azote. Les granules de polyphosphates renferment du calcium. Le silicium n'a pas été détecté dans ces deux types de corpuscules.

A l'automne, le calcium et l'azote sont particulièrement détectés dans le ciment du manteau externe, en association avec des traces de silicium. Les parois fongiques sont moins riches en calcium et en azote et ne renferment pas de silicium. Le manteau interne est plus riche en azote qu'en calcium et en silicium. Une accumulation a été observée dans les parois fongiques, dans le ciment interhyphal et dans les plages de composés polyphénoliques striées. En revanche, le calcium n'est détecté que dans les polyphénols avec du silicium et dans les parois fongiques. Le silicium est également détecté dans le ciment. Des globules vacuolaires fongiques riches en azote ont été observés mais ils ne contiennent pas de silicium ni de calcium.

En hiver, le calcium, l'azote et le silicium sont détectés à l'état de traces dans les parois fongiques et le ciment du manteau externe. La présence de calcium et d'azote est bien marquée dans l'ensemble du manteau interne. Ces éléments présentent une accumulation accrue dans les composés polyphénoliques non striés et le ciment interhyphal. Les parois en contiennent également. Les hyphes renferment le calcium et l'azote dans les globules intravacuolaires. En revanche, le silicium n'est présent qu'à l'état de traces dans les parois fongiques, le ciment, les plages de composés polyphénoliques striées ou non et dans les globules vacuolaires.

3. Le réseau de Hartig

Au printemps, le calcium, l'azote et le silicium sont faiblement présents dans les parois des cellules des deux partenaires. Le ciment interfacial en renferme peu également. En revanche, les composés polyphénoliques vacuolaires contenus dans les cellules corticales voisines du réseau de Hartig accumulent fortement le calcium et l'azote. Les globules azotés et les granules de polyphosphates vacuolaires fongiques n'ont pas été observés.

A l'automne, les différentes structures de la zone d'échange sont globalement pauvres en calcium, azote et silicium. En effet, les parois des deux partenaires renferment de l'azote en faible proportion ainsi que des traces de calcium mais pas de silicium. Le ciment du réseau de Hartig et les polyphénols vacuolaires des cellules corticales voisines accumulent plus le calcium et l'azote mais ne contiennent pas de silicium. Les granules et les globules vacuolaires fongiques n'ont pas été observés.

Pendant la période hivernale, le calcium, l'azote et le silicium sont faiblement détectés dans les parois des cellules des deux partenaires. En revanche, le ciment accumule fortement le calcium et l'azote alors que seules des traces de silicium ont été observées. Les globules vacuolaires fongiques sont riches en azote mais ne renferment ni calcium ni silicium. Le calcium est également associé aux granules de polyphosphates. Dans les cellules corticales voisines du réseau de Hartig, le calcium et l'azote sont concentrés dans les polyphénols vacuolaires. Le silicium n'y a pas été détecté.

4. Le cortex profond

Au printemps, les structures du cortex (parois des cellules corticales et endodermiques, jonctions cellulaires, composés polyphénoliques contenus dans les cellules endodermiques) sont très riches en calcium et en azote. Des traces de silicium ont également été détectées dans ces différentes structures.

A l'automne, le calcium est faiblement présent dans les parois des cellules corticales uniquement. En revanche, l'azote est abondamment stocké dans les jonctions cellulaires où il est associé à du silicium ainsi que dans les parois des cellules endodermiques. Cet élément est détecté en plus faible proportion dans les parois des cellules corticales avec du silicium.

En hiver, le calcium et l'azote sont présents dans les parois des cellules corticales ainsi que dans les jonctions cellulaires et le silicium n'est détecté qu'à l'état de traces dans les parois des cellules corticales. Alors que les parois des cellules endodermiques contiennent de faibles proportions d'azote et de silicium, les composés polyphénoliques vacuolaires de ces cellules renferment en abondance du calcium, de l'azote ainsi que des traces de silicium et d'aluminium.

5. Le cylindre central

Le cylindre central des mycorhizes récoltées **au printemps** est globalement très riche en éléments recherchés. Excepté les parois des cellules du péricycle qui semblent dépourvues de silicium et renferment une faible proportion de calcium et d'azote, et les vaisseaux xylémiens, le reste du cylindre central est très riche en calcium et en azote. En effet, les jonctions cellulaires et les parois des cellules parenchymateuses accumulent le calcium et l'azote et renferment également des traces de silicium. Toutefois, ce sont les composés polyphénoliques contenus dans les vacuoles des cellules du péricycle et surtout du parenchyme qui stockent la majeur partie du calcium et de l'azote ainsi que des traces de silicium dans le cas des polyphénols vacuolaires des cellules endodermiques. Des traces de silicium et de phosphore ont été détectés au niveau du liseré dense bordant la cavité des vaisseaux xylémiens.

A l'automne, le cylindre central est également riche en calcium et en azote mais moins qu'au printemps. Les parois des cellules du péricycle accumulent l'azote et des traces de silicium mais pas le calcium. Toutefois, les polyphénols que contiennent ces cellules renferment du calcium et de l'azote en abondance mais pas de silicium. Les parois des cellules du parenchyme accumulent également l'azote et s'enrichissent en calcium. Ces deux éléments sont fortement stockés dans les polyphénols vacuolaires présents dans les cellules du parenchyme médullaire et dans les jonctions cellulaires. En revanche, seul l'azote est présent dans la paroi épaissie des vaisseaux xylémiens, alors que les trois éléments recherchés sont détectés en faibles proportions dans le liseré pariétal dense qui borde la cavité de ces vaisseaux.

En hiver, les structures du cylindre central sont relativement pauvres en éléments recherchés. En effet, les parois des cellules du péricycle contiennent des traces d'azote et de silicium. Le calcium, l'azote et le silicium sont faiblement présents dans les parois des cellules du parenchyme ainsi que dans les jonctions cellulaires. Si le calcium et l'azote sont présents en

	CONSTITUANTS	SOL PODZOLIQUE					
		PRINTEMPS		*AUTOMNE*		*HIVER*	
		Polysaccharides	Protéines	Polysaccharides	Protéines	Polysaccharides	Protéines
Cortex	Parois des cellules corticales	(+)	++	(+)	+(+)	(+)	++
	Parois des hyphes intracellulaires	+ / ++	+ / ++	+ / ++	+ / ++	+ / ++	+ / ++
	Jonctions cellulaires	-	++	+	+	-	++
	Parois des cellules endodermiques	-	+	-	-	-	-
Cylindre central	Parois des cellules du suber	-	+	-	-	-	-
	Parois des cellules du phellogène	+	+	+	-	+(+)	++
	Parois des cellules du parenchyme	+	++	+	++	+	-
	Jonctions cellulaires	+	+++	+(+)	+(+)	+(+)	(+)
	Parois lignifiées des vaisseaux	-	ze : + ; zid : ++ ; zi : -	-	ze : - ; zi : +	-	-
	Liseré interne des parois du xylème	+	+	++	++	++	+

Tableau 27 : Organisation et nature glycoprotéique des constituants formant les structures présentes dans les racines porteuses de mycorhizes de *Fagus sylvatica* récoltées dans le sol podzolique au cours des saisons. ze : zone externe ; zid : zone intermédiaire ; zi : zone interne.

assez grande proportion dans les vacuoles des cellules parenchymateuses, seules des traces de silicium sont détectées à ce niveau. Le silicium est également présent dans la paroi des vaisseaux xylémiens ainsi que dans le liseré sombre bordant leur cavité lequel contient également de l'azote.

III. LES RACINES PORTEUSES DE MYCORHIZES DE *FAGUS SYLVATICA*

A. ETUDES MORPHOLOGIQUE ET HISTOLOGIQUE

La morphologie et l'organisation structurale des racines porteuses de mycorhizes prélevées dans le sol podzolique, aux trois périodes étudiées, ne présentent pas de modifications particulières par rapport à celles décrites en été.

B. ETUDE ULTRASTRUCTURALE

L'ultrastructure des racines porteuses de mycorhizes provenant du sol podzolique au printemps, à l'automne et en hiver ne varie pas par rapport à celle observée en été (Planche XXXVI, Fig. 1, 2 et 3).

C. ETUDE CYTOCHIMIQUE

Les résultats sont indiqués dans le tableau 27 et dans les planches XXXVII et XXXVIII.

1. Le test PATAg

Aux trois périodes étudiées, les parois des cellules corticales répondent faiblement au test PATAg (Planche XXXVII, Fig. 1, 2 et 3). En revanche, les parois des hyphes intracellulaires sont plus ou moins marquées. Si les jonctions cellulaires du cortex sont faiblement réactives à l'automne, aucun marquage n'est observé au printemps et en hiver. Les parois des cellules endodermiques ne sont généralement pas marquées alors que les composés polyphénoliques qu'elles renferment réagissent positivement au printemps et en hiver avec toutefois une réponse plus intense en hiver.

Les parois des cellules du suber ne sont pas marquées aux trois époques étudiées (Planche XXXVII, Fig. 4, 5 et 6), alors qu'un léger marquage est observé dans les parois des cellules du phellogène. Ce marquage s'intensifie en hiver.

		SOL PODZOLIQUE								
		PRINTEMPS			*AUTOMNE*			*HIVER*		
		Calcium	Azote	Silicium	Calcium	Azote	Silicium	Calcium	Azote	Silicium
Cortex	Parois des cellules corticales	(+)	(+)	traces	traces	traces	-	traces	traces	-
	Parois des hyphes intracellulaires	-	(+)	-	-	(+)	traces	traces	traces	traces
	Parois des hyphes intracellulaires	(+)	(+)	-	+(+)	++	traces	traces	(+)	traces
	Globules fongiques	?	?	?	-	+++	traces	no	no	no
	Granules fongiques	?	?	?	no	no	no	+++ **	-	-
	Polyphénols	+(+)	+(+)	-	++(+)	+++	traces	++	++	traces
	Jonctions cellulaires	traces	+(+)	-	-	-	-	(+)	(+)	-
	Parois des cellules endodermiques	-	-	traces *	-	-	traces	-	-	traces
	Liseré interne pariétal / endoderme	-	-	silice	-	-	silice	-	-	silice
	Polyphénols de l'endoderme	+(+)	+(+)	- *	/	/	/	-	-	traces
Cylindre central	Parois des cellules du suber	-	-	traces	-	traces	traces	(+)	traces	traces
	Liseré interne pariétal / suber	-	-	silice	-	-	silice	-	-	silice
	Polyphénols du suber				++	++	-	++	++	traces
	Parois des cellules du phellogène	-	-	-	+	+	-	-	-	?
	Parois des cellules du parenchyme	-	+	-	-	traces	-	(+)	-	-
	Polyphénols du parenchyme	+(+)	++(+)	- *	++(+)	++(+)	-	+(+)	+(+)	-
	Jonctions cellulaires	-	-	-	+(+)	+(+)	-	+	(+)	-
	Parois lignifiées des vaisseaux	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Liseré interne des parois du xylème	-	+	-	(+)	+	-	(+)	(+)	-

Tableau 28 : Localisations du calcium, de l'azote et du silicium dans les structures présentes dans les racines porteuses de mycorhizes de *Fagus sylvatica* prélevées dans le podzolique au cours des saisons. * : associé à des traces d'aluminium ; ** : associé au phosphore.

Le parenchyme médullaire, les jonctions cellulaires du cylindre central, le liseré pariétal bordant la cavité des vaisseaux réagissent faiblement au test PATAg au printemps (Planche XXXVII, Fig. 7) et à l'automne (Planche XXXVII, Fig. 8). En hiver (Planche XXXVII, Fig. 9), les jonctions cellulaires et les parois des cellules du parenchyme sont également peu marquées.

2. Le marquage de Gomori-Swift

Au printemps (Planche XXXVIII, Fig. 1), à l'automne (Planche XXXVIII, Fig. 2) et en hiver (Planche XXXVIII, Fig. 3), les structures (parois cellulaires, jonctions cellulaires) du cortex racinaire réagissent fortement au réactif de Swift.

Les parois des cellules de l'endoderme, du suber et du phellogène sont peu marquées au printemps (Planche XXXVIII, Fig. 4) et ne présentent aucun marquage à l'automne (Planche XXXVIII, Fig. 5) et en hiver (Planche XXXVIII, Fig. 6) excepté les parois des cellules du phellogène qui sont très réactives en hiver. Les polyphénols accumulés dans les cellules endodermiques réagissent positivement aux trois périodes avec un marquage particulièrement intense en automne.

Dans le cylindre central, au printemps (Planche XXXVIII, Fig. 7), les jonctions cellulaires sont très réactives. Les parois des vaisseaux du xylème se divisent en une zone externe faiblement marquée, une zone intermédiaire qui montre un marquage plus intense et une zone interne plus fine qui ne semble pas réagir au réactif de Swift. A l'automne (Planche XXXVIII, Fig. 8), l'intensité du marquage des parois cellulaires du parenchyme du cylindre central est similaire à celui observé au printemps, alors que celui des jonctions cellulaires semble plus faible. La paroi épaissie des vaisseaux se subdivise en deux zones et non trois comme au printemps. La zone externe n'est pas marquée et la réaction de la zone interne est faible. En hiver (Planche XXXVIII, Fig. 9), le marquage est quasi inexistant. La paroi des vaisseaux apparaît formée d'une seule couche non réactive.

D. Etude analytique

Les analyses effectuées sont regroupées dans le tableau 28.

1. Le cortex

Au printemps, le calcium et l'azote sont faiblement présents dans les parois des cellules corticales. Dans les jonctions cellulaires, le calcium n'est présent qu'à l'état de traces et l'azote est plus abondamment stocké. Les parois des hyphes observées dans les cellules corticales,

contiennent peu de calcium et d'azote. En revanche, ces deux éléments, sont présents en assez grande proportion dans les polyphénols localisés dans le cortex. Le silicium n'a été détecté, à l'état de traces, que dans les parois des cellules corticales. Au niveau de l'endoderme, le calcium et l'azote ne sont pas stockés dans les parois cellulaires. Seules des traces de silicium et d'aluminium y ont été détectées. Toutefois, le calcium et l'azote s'accumulent dans les polyphénols vacuolaires que les cellules endodermiques renferment, associés à de l'aluminium. Le silicium est principalement présent sous la forme d'une bande de silice localisée contre la paroi interne des cellules endodermiques.

A l'automne, les structures corticales sont pauvres en calcium et en azote. En effet, ces deux éléments sont présents à l'état de traces dans les parois cellulaires et ils sont absents des jonctions cellulaires. Toutefois, une accumulation notable de ces éléments a été observée dans les polyphénols corticaux. Comme dans les échantillons provenant de la rendzine, deux types d'hyphes ont pu être distinguées dans le cortex. Des hyphes, à paroi interne claire et à paroi externe sombre, accumulent fortement le calcium et l'azote ainsi que des traces de silicium dans leur paroi. D'autres hyphes, à paroi claire, ne renferment que de faibles proportions d'azote et des traces de silicium mais pas de calcium. Dans ces deux types d'hyphes, des globules vacuolaires riches en azote ont été observés. Dans l'endoderme, seul le silicium a été détecté à l'état de traces dans la paroi épaisse des cellules. Toutefois, une bande de silice similaire à celle déjà remarquée au cours des autres saisons, est présente.

En hiver, de faibles proportions de calcium et d'azote sont détectées dans les parois des cellules corticales, des hyphes intracellulaires et dans les jonctions cellulaires. Le silicium n'est présent qu'à l'état de traces dans les parois hyphales et dans les polyphénols corticaux. Les hyphes intracellulaires présentes dans ce tissu, accumulent le calcium dans les granules de polyphosphates localisés dans leurs vacuoles. Les parois des cellules endodermiques ainsi que leur vacuole contiennent uniquement des traces de silicium. Toutefois, une bande de silice comparable à celle observée précédemment contre la couche pariétale interne de ces cellules, demeure présente dans ces racine porteuses.

2. Le cylindre central

Au printemps, que ce soit au niveau des parois des cellules du suber ou du phellogène, le calcium et l'azote semblent absents. Des traces de silicium ont été détectées dans la paroi des cellules du suber ainsi qu'une bande de silice localisée contre la paroi interne de ces cellules. Les parois des cellules du parenchyme renferment peu d'azote. En revanche, les polyphénols contenus dans ces cellules accumulent fortement le calcium et l'azote ainsi que des traces

d'aluminium. Les jonctions cellulaires ne stockent pas les éléments recherchés. La présence d'azote est peu marquée au niveau des vaisseaux xylémiens. En effet, le calcium et le silicium n'ont pas été détectés et l'azote est peu présent dans le liseré pariétal bordant la cavité des vaisseaux.

A l'automne, les parois des cellules du suber ne renferment que des traces d'azote et de silicium, alors que les polyphénols vacuolaires qu'elles renferment accumulent fortement le calcium et l'azote mais pas le silicium. A cette époque de l'année, les parois des cellules du phellogène s'enrichissent faiblement en calcium et en azote. Les parois des cellules du parenchyme en revanche, ne renferment que des traces d'azote. La plus forte accumulation de calcium et d'azote a été observée dans les polyphénols contenus dans ces cellules ainsi que dans les jonctions cellulaires. Les vaisseaux xylémiens contiennent du calcium et de l'azote en faibles proportions uniquement dans le liseré pariétal dense bordant leur cavité. La présence de silicium n'a pas été révélée dans le cylindre central, excepté au niveau du suber (bande de silice).

Pendant la période hivernale, la paroi des cellules subéreuses renferme peu de calcium ainsi que des traces de silicium et d'azote ; elle est marquée par une bande de silice similaire à celle observée dans l'endoderme. Les polyphénols qu'elles renferment accumulent fortement le calcium et l'azote et contiennent également des traces de silicium. Les cellules du parenchyme renferment du calcium dans leur paroi et du calcium et l'azote s'accumulent dans leurs composés polyphénoliques vacuolaires. Calcium et azote sont présents en faible proportion dans les jonctions cellulaires ainsi que dans le liseré pariétal interne des vaisseaux. Le silicium semble absent de l'ensemble du cylindre central.

DISCUSSION :

Dans ce troisième chapitre, nous nous proposions d'étudier l'évolution saisonnière de nos modèles mycorhiziens et racinaires. Pour cela un prélèvement aux trois autres saisons (printemps, automne, hiver) a été effectué.

La morphologie, l'ultrastructure, la cytochimie des organes étudiés et l'accumulation des éléments minéraux du sol dans les tissus fongiques et racinaires ont alors été analysées.

I. EVOLUTION SAISONNIERE DES MYCORHIZES SUR SOL CALCAIRE

A. EVOLUTION DES STRUCTURES

Dans la rendzine brunifée, les deux mycorhizes ont été récoltées en toute saison et à chaque prélèvement. Les mycorhizes de *Lactarius subdulcis* apparaissent toujours bien renflées, de couleur jaune orangé et d'assez grande taille ; celles de *Cenococcum geophilum* correspondent à de petites massues noires enveloppées par des hyphes extramatricielles bien développées à chaque saison. Tout au long de l'année, les mycorhizes de *Lactarius subdulcis* sont relativement rares, alors que celles de *Cenococcum geophilum* dominent dans ce sol.

L'étude ultrastructurale a montré que, quelle que soit la saison, les cellules fongiques et racinaires sont rarement dégénérescentes. En effet, les hyphes des partenaires fongiques possèdent un cytoplasme relativement dense où certains organites tels que des mitochondries sont observables ; de même, les cellules corticales, toujours très vacuolisées, ont un cytoplasme périphérique contenant de nombreux organites. Les signes de dégénérescence n'apparaissent que pendant l'hiver ce qui tend à rejoindre les observations de certains auteurs sur un ralentissement hivernal de l'activité mycorhizienne. Ainsi, Blasius *et al.* (1989) ont étudié la dynamique saisonnière de mycorhizes de *Picea abies* prélevées dans la Forêt Noire et ont remarqué que, pendant l'hiver, la proportion de mycorhizes en croissance était faible et que les mycorhizes étaient soit mortes soit dormantes par arrêt des activités biologiques et biochimiques (Rastin *et al.*, 1990). D'autre part, la grande proportion de mycorhizes non dégénérescentes que nous avons observé en hiver pourrait s'expliquer par la présence d'une couche de feuilles tombées à l'automne assurant un mulch protecteur contre les fluctuations trop brutales des températures ou contre les températures trop basses (Sreng, 1977). La croissance des mycorhizes serait par contre affectée lorsque les températures atteignent le point de congélation (Blasius *et al.*, 1989).

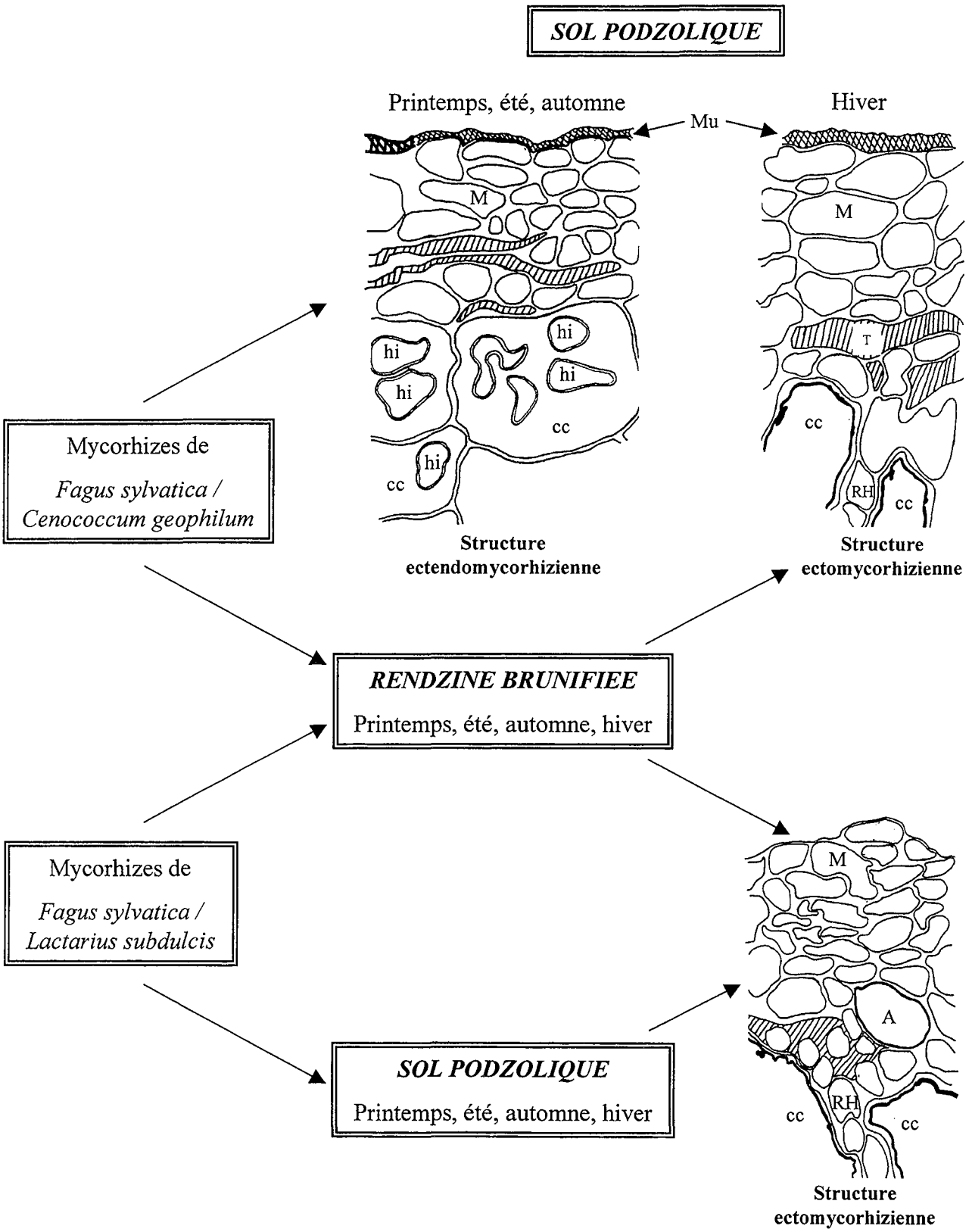


Figure 29 : Evolution saisonnière de l'organisation des mycorhizes de *Cenococcum geophilum* et de *Lactarius subdulcis* récoltées dans le sol calcaire (rendzine brunifiée) et dans le sol acide (sol podzolique). Mu : mucilage ; M : manteau ; A : Ascomycète associé au lactaire ; RH : réseau de Hartig ; T : composés polyphénoliques ; cc : cellule corticale ; hi : hyphe intracellulaire.

Dans la rendzine brunifiée, pendant toute l'année, les deux mycorhizes présentent une organisation ectomycorhizienne typique avec un manteau fongique et un réseau de Hartig unisérié et continu (Figure 29, Tableau 29). Toutefois, à l'automne, une particularité apparaît au niveau du manteau des mycorhizes de *Cenococcum geophilum*, qui se stratifie en un manteau externe constitué d'hyphes de grande taille et mortes et en un manteau interne vivant. Les hyphes vivantes seraient ainsi protégées par une couche de cellules mortes. Cette différenciation du manteau fongique en deux zones distinctes n'est pas observée pendant les autres saisons (hiver, printemps, été) lorsque le mucilage est épais, ce qui confirme son rôle protecteur.

Le champignon ascomycète associé aux mycorhizes de *Lactarius subdulcis* est présent toute l'année. Toutefois, sa capacité d'infection semble relativement faible dans le sol calcaire. Dans toutes les observations, ce champignon est vivant et il se localise toujours dans le manteau et dans le cortex.

Les techniques microanalytiques ont permis de révéler la présence spécifique d'azote dans les globules à contours flous et de calcium dans les granules de polyphosphates des vacuoles fongiques. Toutefois, la distribution de ces corpuscules varie en fonction du champignon et de l'époque annuelle considérés. Dans le cas des mycorhizes de *Lactarius subdulcis*, l'automne se dégage nettement des autres saisons puisque granules et globules fongiques ne sont pas observés à la fois dans le manteau et dans le réseau de Hartig comme pendant le reste de l'année. La fructification du champignon à cette époque de l'année pourrait nécessiter leur hydrolyse. En revanche, la distribution des granules et des globules dans les mycorhizes de *Cenococcum geophilum* ne présentent pas d'évolution particulière. Les globules sont généralement observés dans le manteau et/ou dans le réseau de Hartig pendant toute l'année, alors que les granules sont absents pendant l'automne et présents uniquement dans le manteau le reste de l'année.

B. Evolution des reserves

L'observation des réserves de différentes natures a permis de mettre en évidence une évolution saisonnière qui peut être reliée à l'état physiologique des deux partenaires (Tableau 30). En effet, Griffiths *et al.* (1990) ont suggéré que l'état physiologique notamment de l'arbre était un facteur majeur de l'activité biologique dans les communautés ectomycorhiziennes.

1. Le glycogène

La période printanière se caractérise par une remontée des températures permettant ainsi un redémarrage de l'activité des organismes du sol, qui nécessite de grandes quantités de substances

				PRINTEMPS	*ETE*	*AUTOMNE*	*HIVER*
RENDZINE BRUNIFIEE	Mycorhizes de *Cenococcum geophilum*	Organisation mycorhizienne		Ectomycorhize	Ectomycorhize	Ectomycorhize	Ectomycorhize
		Granules de polyphosphates	Manteau	+	+	-	+
			Réseau de Hartig	-	-	-	-
		Globules azotés	Manteau	+	-	+	+
			Réseau de Hartig	+	+	-	+
	Mycorhizes de *Lactarius subdulcis*	Organisation mycorhizienne		Ectomycorhize	Ectomycorhize	Ectomycorhize	Ectomycorhize
		Granules de polyphosphates	Manteau	+	+	+	+
			Réseau de Hartig	+	+	-	+
		Globules azotés	Manteau	+	+	-	+
			Réseau de Hartig	+	+	+	+
	Racines porteuses de mycorhizes	Organisation racinaire		Non mycorhizienne Bande de silice au niveau de l'endoderme et du suber	Non mycorhizienne Bande de silice au niveau de l'endoderme et du suber	Non mycorhizienne Bande de silice au niveau de l'endoderme et du suber	Non mycorhizienne Bande de silice au niveau de l'endoderme et du suber
SOL PODZOLIQUE	Mycorhizes de *Cenococcum geophilum*	Organisation mycorhizienne		Ectendomycorhize	Ectendomycorhize	Ectendomycorhize	Ectomycorhize
		Granules de polyphosphates	Manteau	-	-	-	+
			Réseau de Hartig	-	+	+	+
		Globules azotés	Manteau	+	+	+	+
			Réseau de Hartig	+	+	+	+
	Mycorhizes de *Lactarius subdulcis*	Organisation mycorhizienne		Ectomycorhize	Ectomycorhize	Ectomycorhize	Ectomycorhize
		Granules de polyphosphates	Manteau	+	+	-	-
			Réseau de Hartig	-	-	-	+
		Globules azotés	Manteau	+	+	+	+
			Réseau de Hartig	-	+	-	+
	Racines porteuses de mycorhizes	Organisation racinaire		Non mycorhizienne Bande de silice au niveau de l'endoderme et du suber	Non mycorhizienne Bande de silice au niveau de l'endoderme et du suber	Non mycorhizienne Bande de silice au niveau de l'endoderme et du suber	Non mycorhizienne Bande de silice au niveau de l'endoderme et du suber

Tableau 29 : Récapitulatif des variations saisonnières de quelques structures caractéristiques des mycorhizes de *Cenococcum geophilum* et de *Lactarius subdulcis* récoltées en sol calcaire (rendzine brunifiée) et en sol acide (sol podzolique).
Les observations ont été effectuées à partir de 10 à 20 échantillons pour chaque sol et pour chaque saison.

carbonées. A cette époque, le glycogène fongique est relativement peu abondant et se localise principalement dans les hyphes du manteau. Il a quasiment disparu des hyphes du réseau de Hartig, ce qui laisse supposer son hydrolyse et son utilisation pour assurer la croissance des partenaires. A la fin de l'été, les réserves de glycogène ont été épuisées par le développement fongique et la croissance racinaire puis deviennent un peu plus abondantes à l'automne, indiquant une reconstitution du stock fongique de polysaccharides. Cette époque correspondant à la période de fructification des champignons, une partie du glycogène fongique peut donc être utilisée pour l'élaboration des carpophores.. Toutefois, *Cenococcum geophilum* est un champignon stérile et la quasi-totalité du glycogène mis en réserve en été et en automne est conservée pendant la période hivernale. Ceci se traduit par une plus forte accumulation de glycogène en hiver comparée à celle observée dans les mycorhizes de lactaire.

L'évolution de la quantité de glycogène dans les mycorhizes étudiées est donc fortement influencée par les saisons et les besoins des deux partenaires.

2. L'azote organique et minéral

Au printemps, l'azote est également fortement accumulé dans les différentes structures mycorhiziennes comme le montrent les analyses et les tests cytochimiques. Cela sous-entend une forte absorption à cette époque de l'année. En effet, la reprise de l'activité des micro-organismes du sol induit une minéralisation de la matière organique et donc la mise à disposition d'une quantité importante d'azote assimilable. Dans le sol calcaire, les mycorhizes de *Cenococcum geophilum* accumulent plus l'azote dans la partie racinaire que dans la partie fongique, indiquant que l'azote inorganique absorbé par le champignon est en grande partie véhiculé vers la racine. En effet, l'azote est fortement détecté dans les racines porteuses essentiellement dans les vaisseaux du xylème (parois et liseré pariétal interne). Nous avons également observé que, dans les mycorhizes récoltées au printemps, les protéines riches en cystine sont abondamment présentes dans le cylindre central. Une part de l'azote est donc utilisée pour la croissance racinaire.

Cette situation est moins nette dans le cas des mycorhizes de *Lactarius subdulcis*. Cela refléterait une différence de capacité d'absorption de la forme d'azote mise à la disposition des deux champignons. En effet, *Cenococcum geophilum* est un Ascomycète qui est susceptible d'utiliser soit l'azote ammoniacal soit l'azote nitrique pour sa croissance (Mikola, 1948 ; Trappe, 1962 ; Martin et Botton, 1993). La nutrition azotée de *Lactarius subdulcis* a été peu étudiée, mais il semblerait que les lactaires absorbent plus aisément l'ammonium que le nitrate (Martin et Botton, 1993). Le sol calcaire étant caractérisé notamment par une prépondérance d'azote

		Eléments	*PRINTEMPS*	*ETE*	*AUTOMNE*	*HIVER*
RENDZINE BRUNIFIEE	Mycorhizes de *Cenococcum geophilum*	Glycogène	+	-	++	+++
		Calcium	++	++	++	+++
		Azote total	+++	++	+++	+++
		Protéines	++	+	++	+++
		Silicium	(+)	(+)	(+)	(+)
	Mycorhizes de *Lactarius subdulcis*	Glycogène	+	-	++	++
		Calcium	++	+	++	++
		Azote total	+++	+	+++	+++
		Protéines	+(+)	++	(+)	+
		Silicium	(+)	(+)	(+)	(+)
	Racines porteuses de mycorhizes	Calcium	++	-	++	++
		Azote total	++	(+)	++	+++
		Protéines	++	(+)	++	+(+)
		Silicium	Bande de silice	Bande de silice	Bande de silice	Bande de silice
SOL PODZOLIQUE	Mycorhizes de *Cenococcum geophilum*	Glycogène	+	-	++	++
		Calcium	++(+)	++	+(+)	+(+)
		Azote total	+++	++	++	++
		Protéines	+++	+(+)	+(+)	++
		Silicium	(+)	(+)	(+)	(+)
	Mycorhizes de *Lactarius subdulcis*	Glycogène	+	-	++	++
		Calcium	+++	++	+(+)	++
		Azote total	+++	++(+)	+++	++(+)
		Protéines	++	++	+++	+++
		Silicium	(+)	(+)	(+)	(+)
	Racines porteuses de mycorhizes	Calcium	(+)	(+)	++(+)	+(+)
		Azote total	+	(+)	+++	+(+)
		Protéines	++	+	+(+)	+
		Silicium	Bande de silice	Bande de silice	Bande de silice	Bande de silice

Tableau 30 : Récapitulatif des variations saisonnières de quelques réserves au sein des mycorhizes de *Cenococcum geophilum* et de *Lactarius subdulcis* récoltées en sol calcaire (rendzine brunifiée) et en sol acide (sol podzolique).
Les analyses ont été effectuées à partir d'une moyenne de 3 à 5 échantillons pour chaque sol et pour chaque saison.

nitrique, *Cenococcum geophilum* peut absorber de fortes quantités de molécules azotées alors que l'absorption de l'azote par *Lactarius subdulcis* est plus réduite. Cela pourrait expliquer également le faible nombre des mycorhizes de lactaire dans le sol calcaire.

Pendant l'été, les proportions d'azote dans les structures des mycorhizes et des racines porteuses étudiées sont moins importantes qu'au printemps ce qui indique une utilisation de ces composés pour le développement des deux partenaires. Dans le cas de *Cenococcum geophilum*, il y aurait une forte mobilisation des protéines riches en cystine de la partie racinaire, comme le montre la faible intensité du marquage des structures mycorhiziennes par le réactif de Gomori-Swift en été par rapport au printemps. L'azote serait utilisé principalement pour la croissance racinaire de l'arbre qui, pour le Hêtre, est maximale du mois de mai jusqu'à la fin du mois de juillet (Hoffman, 1972). En revanche, dans les mycorhizes de *Lactarius subdulcis*, les structures fongiques et racinaires présentent un marquage par le réactif de Gomori-Swift plus marqué en été qu'au printemps. Ceci indiquerait que le lactaire utilise une partie de l'azote pour l'élaboration de ses propres structures alors que *Cenococcum geophilum* transmet la majorité de l'azote absorbé à l'arbre.

Chez *Cenococcum geophilum*, l'azote est principalement transporté sous forme de glutamine, d'alanine et d'arginine (Genetet *et al.*, 1984). Näsholm et Ericsson (1990) ont par ailleurs mesuré une augmentation de la concentration en glutamine dans les aiguilles de *Pinus sylvestris* au printemps et pendant l'été, ce qui indiquerait que cet acide aminé est une forme importante du transport de l'azote chez les arbres (Dickson *et al.*, 1985).

En automne, l'azote stocké sous forme de protéines chez le lactaire, disparaît presque en totalité. Une proportion importante de substances azotées doit assurer la fructification ainsi que le maintien du mycélium dans le sol. En effet, Sreng (1977) a observé une augmentation de la longueur mycélienne à cette époque de l'année. Au contraire, dans le cas de *Cenococcum geophilum*, de l'azote est accumulé dans les structures fongiques. Comme ce champignon est stérile, il s'agit plus d'une mise en réserve de l'azote que d'une mobilisation de cet élément. Une autre fraction est transmise à la racine porteuse qui montre des accumulations d'azote à cette époque de l'année. Ce stockage d'azote dans la racine porteuse est également à relier au jaunissement des feuilles du Hêtre qui se produit en octobre et en novembre (Hoffman, 1972) et induit un transport de substances carbonées et azotées en direction des racines.

En hiver, une forte accumulation d'azote se produit dans les structures fongiques et racinaires des deux mycorhizes ainsi que dans les racines porteuses. Les tests cytochimiques montrent qu'il s'agit de protéines chez les mycorhizes de *Cenococcum geophilum*, mais ce n'est pas le cas des mycorhizes de lactaire.

L'azote détecté dans les mycorhizes et dans les racines porteuses montre donc une évolution saisonnière importante.

C. PROBLEMES LIES AU CALCIUM

Parallèlement aux composés azotés et carbonés simples, les mycorhizes absorbent également des éléments minéraux. La rendzine brunifiée est un sol caractérisé par la présence de carbonate de calcium, faisant effervescence à l'acide chlorhydrique, dès les premiers cm de sol et par une saturation du complexe absorbant par les ions calcium susceptibles d'être absorbés. Toutefois, la période printanière ne se caractérise pas par de très fortes accumulations minérales dans les deux champignons ni dans les racines porteuses. Le calcium, pourtant très abondant à l'état échangeable dans le sol basique, est globalement peu détecté dans les structures mycorhiziennes et racinaires. Ceci traduit une absorption relativement faible de cet élément par le manteau fongique qui semble jouer un rôle de barrière plus ou moins efficace vis-à-vis de cet ion. Le partenaire fongique peut réguler de manière active le transport du calcium vers la racine afin d'éviter une toxicité calcique pour l'arbre. Le Hêtre appartenant plutôt à la catégorie des arbres acidiphiles (Le Tacon, comm. pers.) pourrait donc être sensible à la présence d'ions calcium en excès.

Dans le cas de la mycorhize de *Cenococcum geophilum*, la présence de mucilage en surface lui permettrait de bloquer davantage le calcium et d'en limiter ainsi l'absorption. Ce champignon serait donc plus efficace vis-à-vis du calcium du sol que le lactaire. Le rôle de barrière du manteau fongique dans l'absorption des ions a déjà été mis en évidence chez d'autres champignons (Kottke *et al.*, 1994 ; Pargney et Genet, 1994 ; Le Disquet, 1997).

L'importance des champignons ectomycorhiziens sur le comportement d'arbres sur sol calcaire est connue depuis longtemps (Le Tacon, 1976 ; Clément *et al.*, 1977). La notion de champignons calcicoles, calcifuges ou indifférents au calcium a ainsi été définie pour rendre compte du degré de tolérance des organismes fongiques vis-à-vis de cet élément. Les champignons calcifuges, au même titre que les plantes calcifuges, sont incapables de limiter l'absorption des ions calcium (Passama *et al.*, 1975 ; Bousquet *et al.*, 1981 ; Lapeyrie et Bruchet, 1986). En effet, des études menées sur des mycorhizes récoltées dans un substrat enrichi en calcium, ont montré que les souches ou les espèces fongiques sensibles accumulent des quantités d'ions calcium plus élevées que les champignons calcicoles (Lapeyrie et Bruchet, 1986 ; Kottke *et al.*, 1995). Toutefois, Lapeyrie et Bruchet (1986) ont montré que la souche calcifuge de *Paxillus involutus* était plus sensible au pH et à la concentration en ions bicarbonates qu'à la concentration en ions calcium. Ce n'est pas le cas général puisque ces mêmes auteurs (Lapeyrie

et Bruchet, 1982) ont également montré qu'une souche de *Cenococcum graniforme* était totalement indifférente aux ions bicarbonates.

Parmi les mécanismes impliqués, les champignons pourraient agir comme des filtres ou excréter dans le milieu extérieur des acides organiques tels que l'acide oxalique qui se complexent avec les ions calcium pour former des cristaux d'oxalate de calcium (Malajczuk et Cromack, 1982 ; Lapeyrie, 1983 ; Lapeyrie *et al.*, 1987). Ainsi, ils diminuent la disponibilité du calcium dans le sol et même favorisent celle d'autres éléments comme le phosphore (Mousain, 1989). Dans le cas des deux champignons que nous avons étudiés, aucune formation cristalline de calcium n'a cependant été observée.

Nos travaux n'ont pas permis de mettre clairement en évidence une calcicolie ou une calcifugie éventuelle des deux champignons étudiés. En effet, dans le cadre de l'étude réalisée en culture pure par Lapeyrie et Bruchet (1986) sur deux souches (calcicole et calcifuge) de *Paxillus involutus*, les doses de calcium employées étaient bien supérieures aux quantités trouvées dans les sols de notre étude.

Toutefois, il apparaît que *Cenococcum geophilum* accumule en abondance le calcium dans le sol calcaire au cours des différentes saisons. Il présenterait donc une certaine indifférence vis-à-vis des ions calcium et du pH basique qui en découle. Cela d'autant plus qu'il a été trouvé en très grand nombre dans le sol calcaire et que sa rareté dans le sol acide est plutôt due à une faible compétitivité par rapport aux autres champignons du sol. *Lactarius subdulcis* en revanche stocke moins le calcium. Ce champignon pourrait limiter son absorption notamment par l'excrétion d'acides organiques.

Les saisons ne semblent donc pas avoir d'influence nette sur l'absorption des ions calcium dans les deux mycorhizes étudiées. La régulation par les champignons de l'absorption des ions calcium s'exercerait toute l'année.

D. Le cas du silicium

L'élément silicium a été détecté en faibles proportions dans la plupart des structures fongiques et racinaires des deux mycorhizes. Il est donc absorbé par les deux champignons et transmis à la plante. Il ne montre cependant pas d'accumulation particulière et semble être transporté en continu par le biais du courant d'évapotranspiration (Bartoli, 1981 ; Marschner, 1986). L'été est marqué par une faible accumulation de silicium, ce qui peut s'expliquer par des courants de sève réguliers et continus ne lui permettant pas de se fixer à des structures. Au contraire, à l'automne et en hiver, une accumulation de silicium dans les structures fongiques des mycorhizes montre que le flux de sève en ralentissant lui permet de s'immobiliser.

Dans les racines de plus gros diamètre, tout au long de l'année, on le trouve principalement le long de la paroi interne des cellules de l'endoderme et du suber sous la forme d'une bande de silice. La formation de cette bande résulterait notamment d'un faible courant d'absorption radiale au niveau des cellules de l'endoderme permettant ainsi son immobilisation. De plus, la rupture des voies de transport symplasmique et apoplasmique à travers l'endoderme limite fortement son transport vers l'intérieur de l'organe.

Les saisons ne semblent donc pas avoir une influence directe sur l'absorption et le transport du silicium dans les mycorhizes. Le transit de cet élément serait plutôt fonction de l'état physiologique du végétal.

II. EVOLUTION SAISONNIERE DES MYCORHIZES SUR SOL ACIDE

A. EVOLUTION DES STRUCTURES

Aucune variation saisonnière n'a été observée sur la morphologie des deux mycorhizes provenant du sol acide. La forme et la couleur des organes symbiotiques ne varient pas au cours de l'année, ni par rapport au sol calcaire. Toutefois, les mycorhizes de *Cenococcum geophilum* présentent un mycélium extramatriciel beaucoup plus important que dans le sol calcaire. Si la taille des mycorhizes de *Lactarius subdulcis* reste similaire à celle des mycorhizes issues du sol basique, les mycorhizes de *Cenococcum geophilum* présentent une taille plus importante dans le sol acide que dans la rendzine. A l'inverse les mycorhizes de lactaires sont majoritaires pendant toute l'année dans le sol acide. Cela résulte plus des conditions de pH et de source azotée dans les sols que d'un effet des saisons comme nous l'avons évoqué précédemment.

Dans le sol acide, les mycorhizes sont généralement vivantes bien que certains échantillons hivernaux présentent des signes de dégénérescence comme dans le cas du sol calcaire. La présence d'une litière épaisse à la surface du sol explique que peu de mycorhizes sont dégénérescentes. A la différence du sol calcaire, cette litière épaisse est présente toute l'année dans le sol acide car la minéralisation de la matière organique est très lente. Il n'est ainsi pas rare que la litière soit composée de feuilles d'âges différents s'étalant sur 5 à 7 ans (Sreng, 1977). Elle peut donc servir de protection pendant l'hiver contre les températures basses mais également pendant le reste de l'année, particulièrement par temps de sécheresse. En effet, Toutain (1974) et Sreng (1977) ont indiqué que l'eau reste en partie stockée à la base de la litière évitant ainsi un dessèchement qui pourrait être préjudiciable pour les organismes du sol, nombreux dans les horizons de surface.

Dans le sol acide, le manteau des mycorhizes de lactaire est toujours divisé en deux zones distinctes par mort des hyphes externes alors que celui des mycorhizes de *Cenococcum geophilum* est toujours entièrement vivant. D'autre part, si les mycorhizes de *Lactarius subdulcis* montrent un réseau de Hartig tout au long de l'année dans le sol acide (comme dans le sol calcaire), les mycorhizes de *Cenococcum geophilum* adoptent un comportement différent (Figure 29, Tableau 29). En effet, dans le sol podzolique, deux phases peuvent être notées : la phase hivernale pendant laquelle des ectomycorhizes sont élaborées et le reste de l'année où le champignon établit une structure proche de celle des ectendomycorhizes. Dans le deuxième chapitre de ce travail, nous avions émis l'hypothèse que ce changement d'ultrastructure, déjà observé en été entre les deux sols, pouvait être lié à la nature du substrat et notamment à la richesse ou à la pauvreté en phosphore de ce substrat comme l'avaient remarqué Fortas et Chevalier (1988).

L'Ascomycète associé aux mycorhizes de *Lactarius subdulcis* est présent tout au long de l'année et davantage observé que dans les échantillons provenant de la rendzine brunifiée, ce qui laisse supposer qu'il présente une capacité d'infection plus importante.

Dans le sol acide, aucune variation saisonnière de la distribution des granules et des globules fongiques n'a été observée. Généralement, les granules sont absents des hyphes de *Cenococcum geophilum* au printemps, alors que les globules sont présents toute l'année. Chez *Lactarius subdulcis*, les granules ne sont pas observés en automne et sont présents le reste de l'année dans le manteau ou dans le réseau de Hartig. Les globules sont en revanche élaborés à chaque saison excepté au printemps et à l'automne dans le réseau de Hartig.

B. Evolution des reserves

1. Le glycogène

Les réserves de glycogène fongique des deux mycorhizes présentent une évolution saisonnière similaire dans le sol acide et dans le sol calcaire (Tableau 30). Ces composés polysaccharidiques sont utilisés au cours des périodes printanière et estivale pour la croissance des deux partenaires puis sont progressivement reconstitués à l'automne et sont très abondants en hiver.

2. L'azote organique et minéral

Une forte accumulation de composés azotés se produit au printemps en partie sous la forme organique comme l'indique la réaction intense des structures des mycorhizes au réactif de

Gomori-Swift. Globalement, les structures mycorhiziennes accumulent moins l'azote pendant l'été, ce qui laisse penser qu'il est utilisé pour l'élaboration de structures fongiques et racinaires.

Cependant, à cette époque de l'année, les deux mycorhizes accumulent plus cet élément dans le sol acide que dans le sol basique. Cela pourrait s'expliquer notamment par la préférence des champignons pour la forme ammoniacale de l'azote pour leur croissance. En effet, l'ammonium étant majoritairement présent dans le sol acide, son absorption par les partenaires fongiques s'en trouve facilitée. Le stockage important d'azote dans les mycorhizes de *Lactarius subdulcis* dans le sol acide confirmerait cette préférence déjà évoquée par Martin et Botton (1993).

A l'automne, les mycorhizes de lactaire sont très riches en azote alors que les mycorhizes de *Cenococcum geophilum* le sont moins. La formation de carpophores par le lactaire implique une consommation accrue de composés carbonés et azotés. A cette époque de l'année, la fructification est donc un puits important. Dans le cas de *Cenococcum geophilum*, en revanche, la proportion d'azote détectée dans les mycorhizes peut être due à une activité moindre du champignon à cette époque de l'année et/ou une absorption plus faible du fait d'une minéralisation ralentie de l'azote.

En hiver, l'azote est fortement accumulé dans les structures fongiques et racinaires des mycorhizes de *Lactarius subdulcis* alors que dans les mycorhizes de *Cenococcum geophilum*, il l'est moins. Une partie de cet azote est utilisée pour l'élaboration de protéines riches en cystine induisant un marquage par le réactif de Gomori-Swift plus intense en hiver que pendant l'automne précédent, notamment dans les mycorhizes de *Cenococcum geophilum*. Il se produit ainsi une mise en réserve de l'azote dans les mycorhizes.

Nos résultats ont donc permis de dégager une évolution saisonnière des composés azotés similaire à celle observée dans le sol basique (Tableau 30). Une variation de la localisation des éléments se retrouve également dans le cas des racines porteuses de mycorhizes.

C. L'ABSORPTION ET LE STOCKAGE DES AUTRES ELEMENTS MINERAUX

Au printemps, parmi les éléments minéraux, le calcium est abondamment accumulé dans les structures fongiques et racinaires des deux mycorhizes. A cette époque de l'année, comme en été, cet élément est davantage accumulé dans les mycorhizes récoltées dans le sol acide par rapport au sol calcaire. Dans le chapitre II de ce travail, nous avions émis les hypothèses selon lesquelles l'âge des mycorhizes et la disponibilité des éléments dans le sol pouvaient expliquer ces résultats analytiques. Une faible disponibilité du calcium dans le substrat induirait son absorption et son transport notamment sous forme de complexes solubles. En effet, ce

phénomène existe pour d'autres éléments comme le fer qui est absorbé via la formation de complexes sidérophores-fer par les agents biologiques (Watteau, 1990).

En été, à l'automne et en hiver, dans le sol acide, le calcium est moins stocké dans les structures mycorhiziennes. Cela s'expliquerait par une utilisation de cet élément sans apport important du fait d'une absorption faible. Généralement, quelle que soit la saison, les structures des mycorhizes de *Lactarius subdulcis* accumulent plus d'éléments que celles des mycorhizes de *Cenococcum geophilum*. La présence de mucilage de surface peut contribuer à limiter l'absorption du calcium par *Cenococcum geophilum*.

La présence de l'élément silicium dans les mycorhizes ne montre pas de variation notable entre les différentes saisons, ni par rapport au sol calcaire. Cela confirme bien que l'absorption et le transport de cet élément sont indépendants de la mycorhize considérée, du type de sol et des saisons. Il présente, en revanche, une localisation privilégiée dans les racines porteuses de mycorhizes au niveau de l'endoderme et du suber comme dans le cas du sol calcaire.

Une évolution saisonnière, en relation avec les besoins des deux partenaires, se dégage donc de la cytolocalisation des ions dans le sol acide que ce soit dans les deux mycorhizes ou dans les racines porteuses de mycorhizes. Le printemps se caractérise par une forte mobilisation des réserves, notamment fongiques, qui sont utilisées pour la croissance des deux partenaires. A partir de l'automne, ces réserves sont progressivement reconstituées.

CONCLUSION :

Ce dernier chapitre avait pour objectif de mettre en évidence un effet des saisons sur les modèles mycorhiziens étudiés.

- Nous avons montré dans un premier temps que les saisons ne semblent pas avoir d'incidence majeure sur le développement mycorhizien et sur la morphologie des organes symbiotiques. En effet, au cours des saisons, les mycorhizes de *Cenococcum geophilum* sont dominantes dans le sol calcaire et celles de *Lactarius subdulcis* le sont dans le sol acide. De plus, les deux mycorhizes se sont révélées vivantes pendant toute l'année excepté peut être une baisse de vitalité des cellules végétales notamment en hiver.

- En revanche, l'organisation mycorhizienne peut varier. Ainsi, pendant les quatre saisons, *Lactarius subdulcis* forme des ectomycorhizes ce qui indique que ce champignon est exclusivement ectomycorhizien. Par contre, *Cenococcum geophilum* modifie son comportement selon la période de prélèvement. Ainsi, il forme également des ectomycorhizes pendant l'hiver alors que le reste de l'année, ce sont des mycorhizes proches du type ectendomycorhizien qui sont élaborées. Cependant, ces variations ultrastructurales ont plutôt été reliées à un effet du substrat. L'importance du phosphore et de l'aluminium dans ces modifications n'est pas à exclure.

- Une évolution saisonnière a été mise en évidence concernant l'évolution de certaines réserves carbonées, azotées et des éléments minéraux. C'est particulièrement le cas du glycogène et de l'azote. Dans le cas du calcium, une évolution saisonnière a pu être dégagée pour les deux champignons dans le sol podzolique. En revanche, l'évolution saisonnière dans la rendzine brunifiée est moins nette.

Ainsi, au printemps, l'arbre est en pleine croissance et a donc d'importants besoins qui sont en partie assurés par les champignons mycorhiziens grâce aux réserves hivernales (phosphore, glucides, éléments minéraux). Au début de l'été, le développement des champignons est intense et ils constituent un puits important de photosynthétats produits par le Hêtre. Cela jusqu'à l'automne où, dans le cas de *Lactarius subdulcis*, la fructification va se produire. Enfin, en hiver, la croissance des deux partenaires est fortement ralentie. Les réserves ont été reconstituées et sont localisées en grande partie dans les champignons mycorhiziens et dans les racines.

- L'étude des racines porteuses de mycorhizes a révélé que ces organes sont généralement assez pauvres en éléments en été. Toutefois, au printemps, à l'automne et en hiver, des

proportions parfois très importantes d'azote et de minéraux sont détectées dans les racines porteuses. Les nutriments sont donc susceptibles d'être acheminés en abondance via les mycorhizes vers le reste du système racinaire et vers les parties aériennes de l'arbre. Les racines porteuses ne constituent qu'une portion du système de conduction des nutriments vers les tiges et les feuilles. Les analyses réalisées sur ces organes ne correspondent donc qu'à une situation ponctuelle et n'intègrent pas les flux d'éléments.

La bande de silice est présente contre la paroi des cellules de l'endoderme et du suber tout au long de l'année. Les faibles courants d'absorption au niveau de l'endoderme permettraient sa formation. Elle contribuerait ainsi à préserver la racine contre les pathogènes mais également à limiter l'absorption des éléments du sol.

CHAPITRE III :

PLANCHES XXI A XXXVIII

ETUDE ULTRASTRUCTURALE DES MYCORHIZES NATURELLES DE *Fagus sylvatica* L. EN ASSOCIATION AVEC *Cenococcum geophilum* L.

Site de prélèvement : **site de la Crédence, rendzine brunifiée.**

Période de prélèvement : **printemps, automne, hiver 1996.**

Double coloration acétate d'uranyle – citrate de plomb

Abréviations : mu : mucilage ; h : hyphe ; c : ciment ; têtes de flèches : globules azotés ; T : composés polyphénoliques ; cc : cellules corticales ; RH : réseau de Hartig ; Mi : manteau interne ; flèches : granules de polyphosphates

Figure 1 : La structure des mycorhizes de *Cenococcum geophilum* est de type ectomycorhizien quelle que soit la période de récolte des échantillons, sur la rendzine brunifiée. x 6500

Figure 2 : Au printemps, dans le manteau interne, les hyphes renferment des granules de petite taille et circulaires qui correspondent à des granules de polyphosphates. x 50000.

Figure 3 : Récolte printanière. Les hyphes du manteau interne peuvent également contenir des globules à contours flous, peu denses et riches en azote. x 24000

Figure 4 : Au printemps, des globules azotés sont observés dans les vacuoles des hyphes du réseau de Hartig. x 20000

Figure 5 : Dans les échantillons prélevés à l'automne, les hyphes du manteau interne contiennent des globules azotés. x 12700

Figure 6 : Pendant l'automne, aucun globule azoté n'est observé dans les vacuoles des hyphes du réseau de Hartig. x 12000

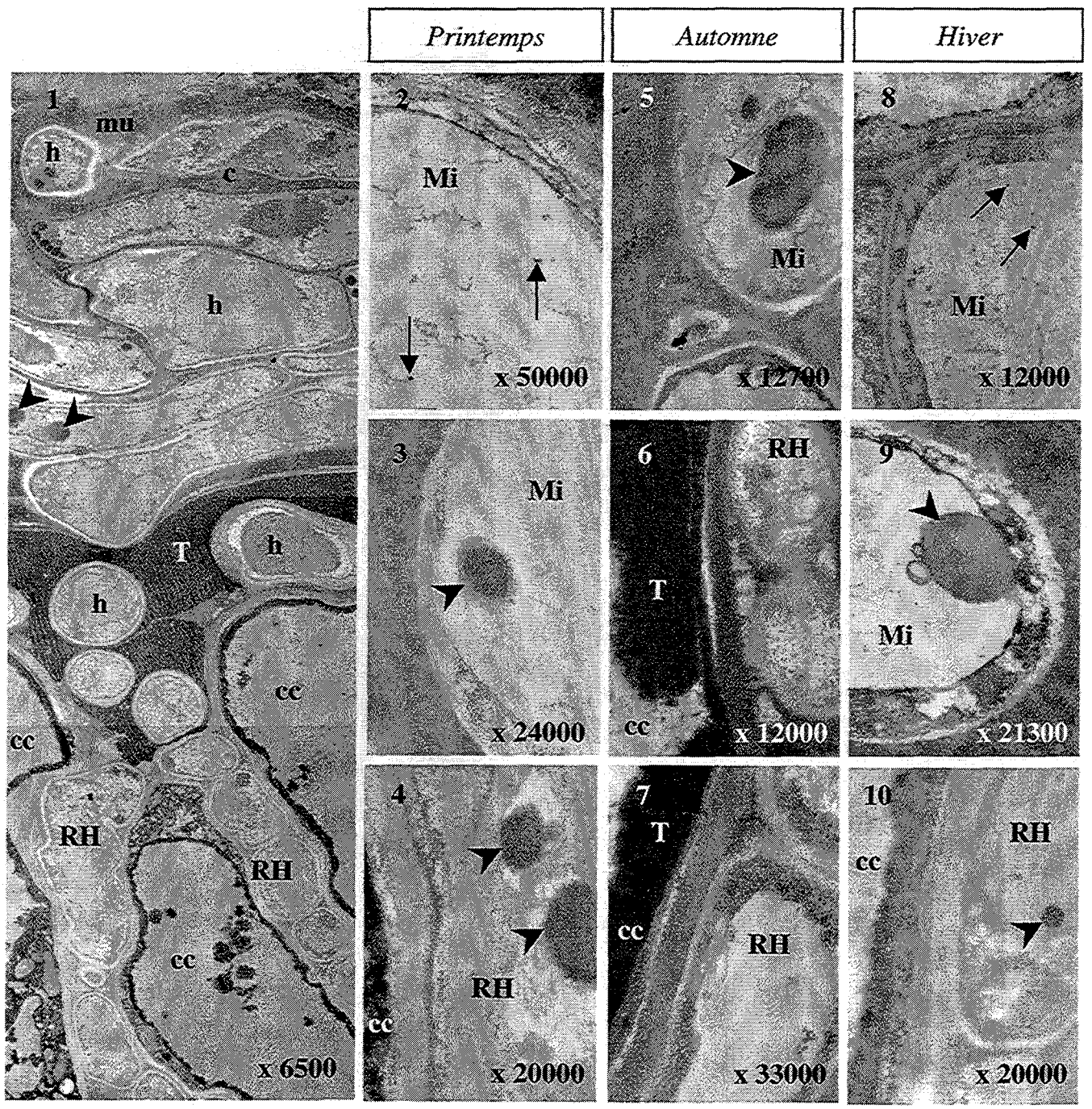
Figure 7 : Les granules de polyphosphates semblent absents des vacuoles des hyphes du réseau de Hartig à l'automne. x 33000

Figure 8 : En hiver, les hyphes du manteau interne renferment des granules de polyphosphates vacuolaires. x 12000

Figure 9 : Les échantillons hivernaux contiennent également des globules azotés dans les vacuoles des hyphes du manteau interne. x 21300

Figure 10 : En hiver, au niveau des hyphes du réseau de Hartig, seuls les globules vacuolaires azotés ont été observés. x 20000

PLANCHE XXI


Printemps
Automne
Hiver
1
mu
h
c
h
T
h
h
cc
cc
RH
RH
cc
x 6500
2
Mi
x 50000
5
Mi
x 12700
8
Mi
x 12000
3
Mi
x 24000
6
RH
T
cc
x 12000
9
Mi
x 21300
4
RH
cc
x 20000
7
T
cc
RH
x 33000
10
RH
cc
x 20000

ETUDE CYTOCHIMIQUE DES MYCORHIZES NATURELLES DE *Fagus sylvatica* L. EN ASSOCIATION AVEC *Cenococcum geophilum* L.

Site de prélèvement : **site de la Crédence, rendzine brunifiée.**

Période de prélèvement : **printemps, automne, hiver 1996.**

Mise en évidence des polysaccharides par le test PATAg

Abréviations : mu : mucilage ; h : hyphe ; T : composés polyphénoliques ; c : ciment ; cc : cellule corticale ; RH : réseau de Hartig ; e : endoderme ; p : parenchyme ; j : jonction cellulaire ; px : paroi des vaisseaux xylémiens ; flèche : glycogène ; pv : paroi végétale ; pf : paroi fongique.

Au printemps, le mucilage recouvrant les mycorhizes est réactif au test PATAg. Les parois des hyphes constituant le manteau et le réseau de Hartig sont peu marquées alors que les parois des cellules corticales voisines du réseau le sont plus. Les structures pariétales et les jonctions cellulaires du cortex profond sont fortement marquées. Dans le cylindre central, le marquage est présent principalement au niveau des parois du parenchyme, des jonctions cellulaires et du liseré qui borde la cavité des vaisseaux du xylème.

Figure 1 : Structures du manteau fongique des mycorhizes au printemps. x 4700

Figure 4 : Détail du réseau de Hartig au printemps. x 12000.

Figure 7 : Détail du cortex profond des mycorhizes au printemps. x 20000

Figure 10 : Détail du cylindre central mycorhizien au printemps. x 4400

A l'automne, la surface de la mycorhize est très réactive, de même que les parois des cellules du manteau externe. Le ciment est également bien marqué. Dans le manteau interne, le marquage semble plus faible. Les structures du réseau de Hartig sont peu réactives. Le cortex profond n'est pas marqué excepté le cytoplasme des cellules corticales et seul un léger marquage a été observé au niveau du parenchyme et des jonctions cellulaires du cylindre central.

Figure 2 : Région du manteau des mycorhizes récoltées à l'automne. x 3200

Figure 5 : Détail du réseau de Hartig. x 4900

Figure 8 : Cortex profond d'une mycorhize. x 12000

Figure 11 : Détail du cylindre central mycorhizien. x 12000

En hiver, le mucilage réagit fortement au test PATAg. Les parois des hyphes du manteau ainsi que le ciment sont également réactifs. Un fort marquage est observé au niveau du glycogène cytoplasmique qui est très abondant. Au niveau du réseau de Hartig, les parois des deux partenaires réagissent peu à ce test. Le ciment semble montrer un marquage plus intense. Les parois des cellules endodermiques ne sont pas marquées et, dans le cylindre central, les jonctions cellulaires, les parois des cellules du parenchyme et le liseré pariétal bordant la cavité des vaisseaux sont marqués.

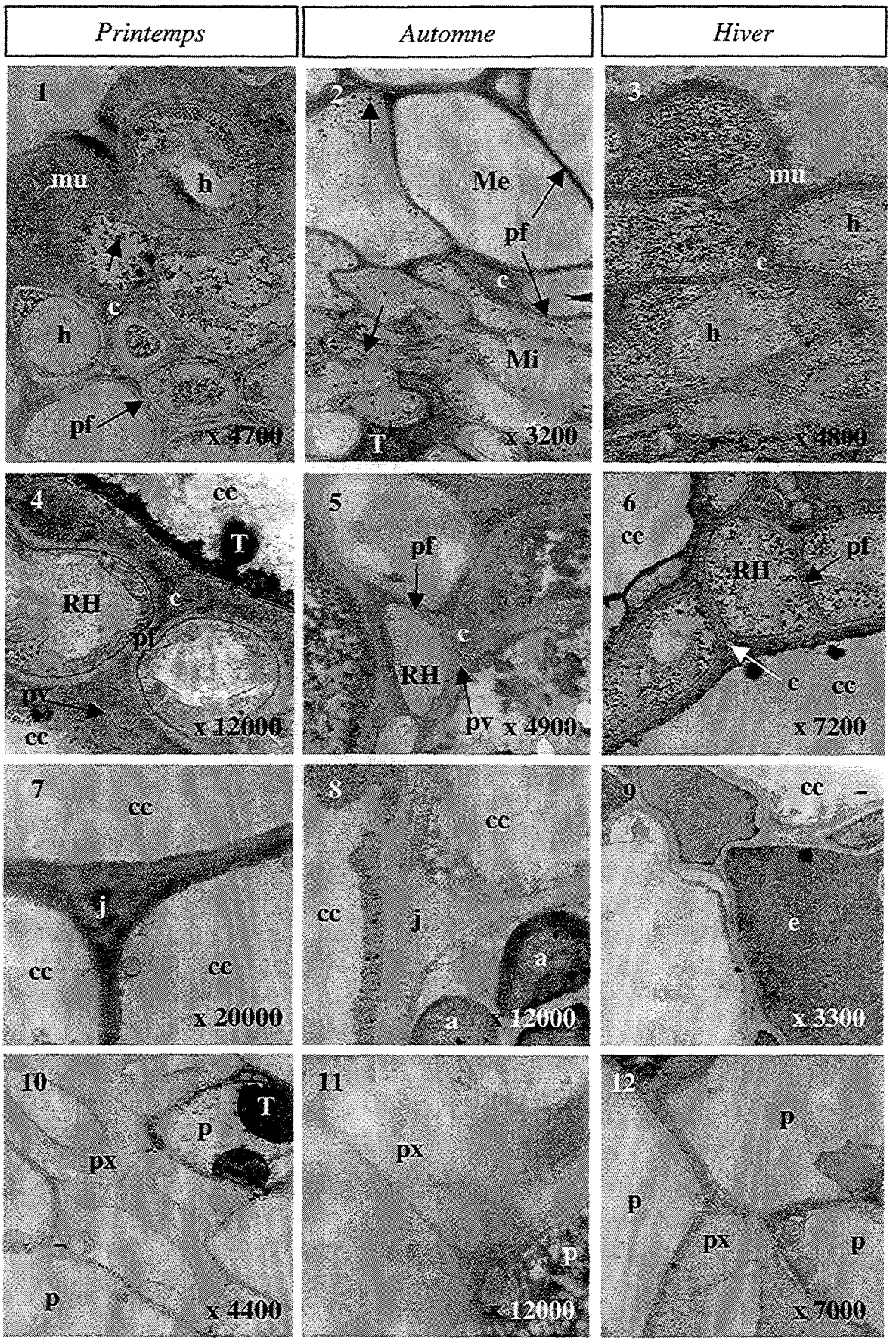
Figure 3 : Région du manteau fongique. x 4800

Figure 6 : Détail du réseau de Hartig. x 7200

Figure 9 : Portion de l'endoderme d'une mycorhize. x 3300

Figure 12 : Cylindre central d'une mycorhize de *Cenococcum geophilum.* x 7000

PLANCHE XXII



ETUDE CYTOCHIMIQUE DES MYCORHIZES NATURELLES DE *Fagus sylvatica* L. EN ASSOCIATION AVEC *Cenococcum geophilum* L.

Site de prélèvement : **site de la Crédence, rendzine brunifiée.**

Période de prélèvement : **printemps, automne, hiver 1996.**

Mise en évidence des protéines riches en cystine par le réactif de Gomori-Swift

Abréviations : mu : mucilage ; h : hyphe ; T : composés polyphénoliques ; c : ciment ; cc : cellule corticale ; RH : réseau de Hartig ; p : parenchyme ; j : jonction cellulaire ; px : paroi des vaisseaux xylémiens ; têtes de flèches : globules azotés ; pv : paroi végétale ; pf : paroi fongique.

Au printemps, le mucilage recouvrant les mycorhizes est réactif alors que les parois des hyphes du manteau et le ciment interhyphal le sont peu. Des globules denses vacuolaires sont observés dans les hyphes. Le cytoplasme de ces dernières est également fortement marqué. Au niveau du réseau de Hartig, les parois des deux partenaires sont peu marquées. En revanche, le marquage du cytoplasme des hyphes est plus intense. Une très forte réaction est observée au niveau du ciment et des globules vacuolaires. Les structures du cortex profond sont peu marquées, alors que celles du cylindre central sont très réactives.

Figure 1 : Structures du manteau fongique des mycorhizes. x 3000

Figure 4 : Détail du réseau de Hartig au printemps. x 4400.

Figure 7 : Détail du cortex profond des mycorhizes. x 4400

Figure 9 : Détail du cylindre central mycorhizien. x 7000

A l'automne, la surface de la mycorhize est très réactive, de même que les parois des cellules du manteau. Le ciment est également bien marqué. Les structures du réseau de Hartig sont peu réactives. Dans le cylindre central, les jonctions cellulaires, les parois des cellules du parenchyme et des vaisseaux sont fortement marquées.

Figure 2 : Région du manteau des mycorhizes récoltées à l'automne. x 3400

Figure 5 : Détail du réseau de Hartig. x 20000

Figure 10 : Détail du cylindre central mycorhizien. x 7000

En hiver, le mucilage et la couche la plus superficielle des hyphes du manteau sont peu marqués par le réactif de Swift. En revanche, la zone interne du manteau est très réactive. Au niveau du réseau de Hartig, les parois des deux partenaires réagissent et le ciment montre un marquage relativement intense. Les parois des cellules corticales du cortex profond et les jonctions cellulaires sont fortement marquées.

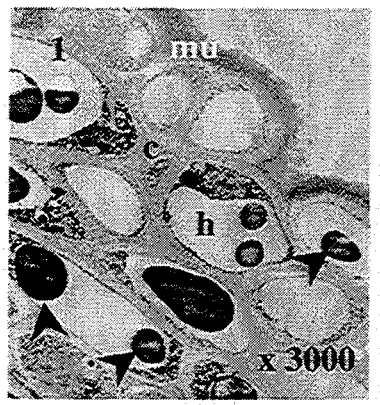
Figure 3 : Région du manteau fongique. x 4900

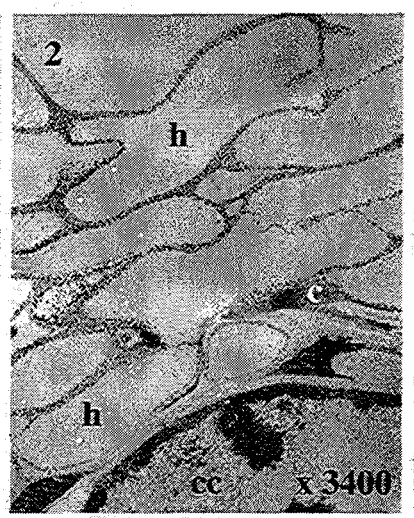
Figure 6 : Détail du réseau de Hartig. x 12700

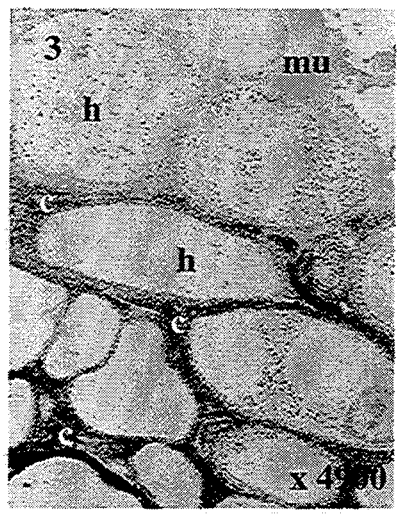
Figure 8 : Cortex profond d'une mycorhize. x 7000

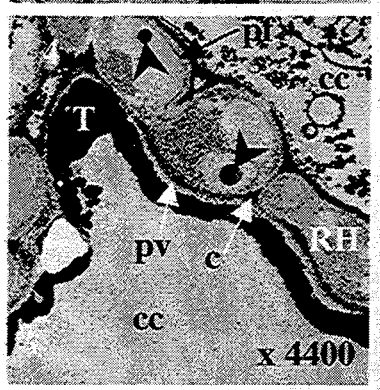
PLANCHE XXIII

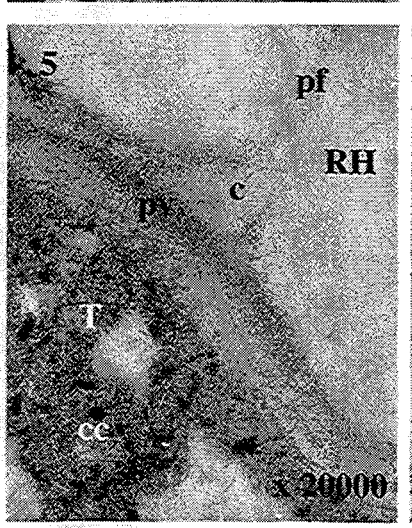
Printemps	*Automne*	*Hiver*

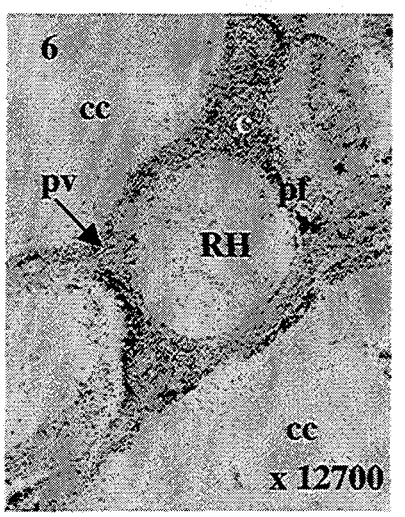


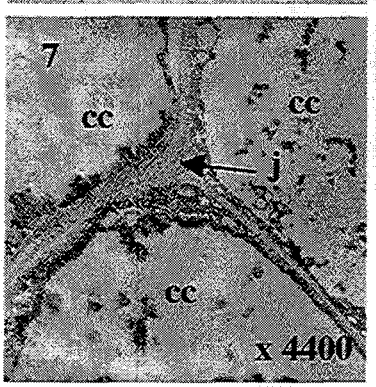


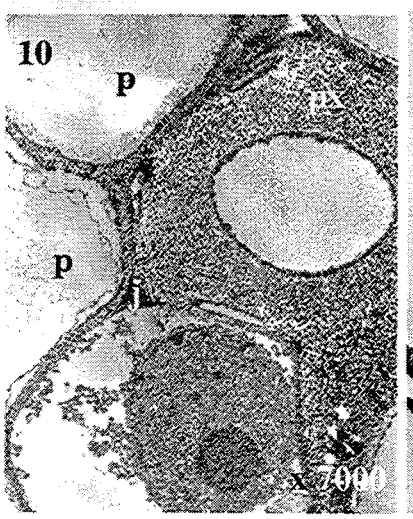


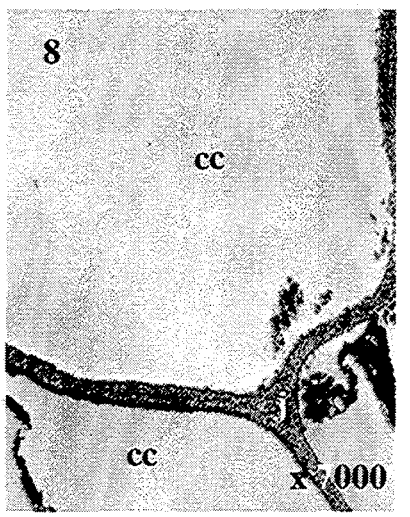


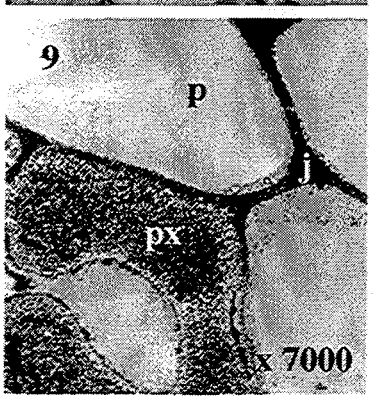












ETUDE ULTRASTRUCTURALE DES MYCORHIZES NATURELLES DE *Fagus sylvatica* L. EN ASSOCIATION AVEC *Lactarius subdulcis* Fr., ss. Q., Lange

Site de prélèvement : **site de la Crédence, rendzine brunifiée.**

Période de prélèvement : **printemps, automne, hiver 1996.**

Abréviations : h : hyphe ; c : ciment ; têtes de flèches : globules azotés ; T : composés polyphénoliques ; cc : cellules corticales ; RH : réseau de Hartig ; Me : manteau externe ; Mi : manteau interne ; flèches : granules de polyphosphates ; gl : glycogène ; pv : paroi végétale ; pf : paroi fongique.

Figure 1 : *Lactarius subdulcis* forme des ectomycorhizes quelle que soit la période de récolte des échantillons, sur la rendzine brunifiée. x 3300

Figure 2 : Au printemps, dans le manteau interne, les hyphes renferment des granules de polyphosphates. x 30000.

Figure 3 : Récolte printanière. Les hyphes du manteau interne contiennent également des globules à contours flous et riches en azote. x 11200

Figure 4 : Au printemps, des globules azotés sont observés dans les vacuoles des hyphes du réseau de Hartig. x 11200

Figure 5 : Dans les échantillons prélevés au printemps, des granules de polyphosphates sont observés dans les hyphes du réseau de Hartig. x 30000

Figure 6 : Pendant l'automne, des granules de polyphosphates sont présents dans les hyphes du manteau interne. x 14400

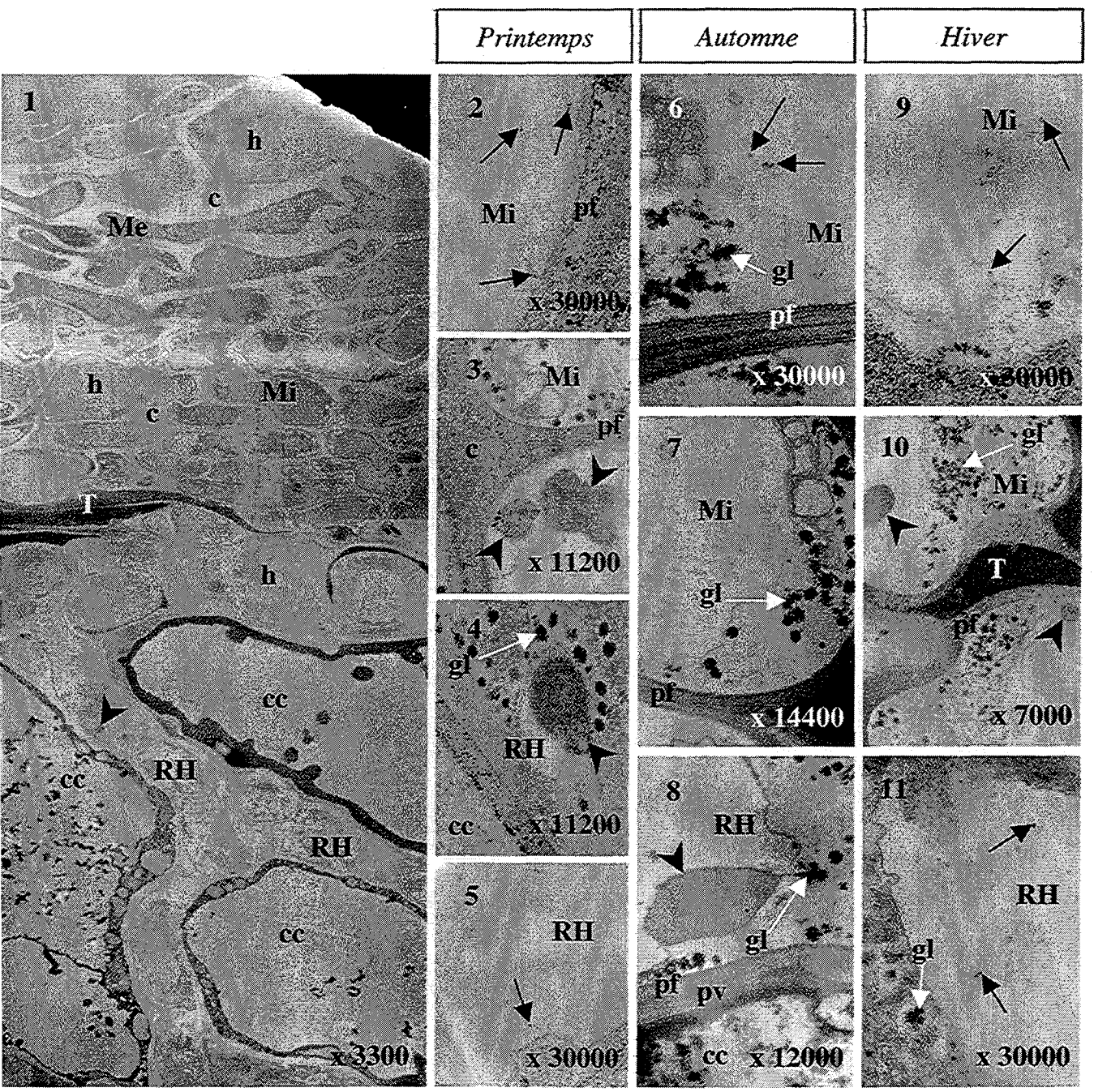
Figure 7 : Au cours de l'automne, aucun globule azoté n'est observé dans les vacuoles des hyphes du manteau interne. x 14400

Figure 8 : Les globules azotés sont en revanche présents dans les vacuoles des hyphes du réseau de Hartig à l'automne. x 12000

Figure 9 : En hiver, les hyphes du manteau interne renferment des granules de polyphosphates vacuolaires. x 30000

Figure 10 : Les échantillons hivernaux contiennent également des globules azotés dans les vacuoles des hyphes du manteau interne. x 7000

Figure 11 : En hiver, au niveau des hyphes du réseau de Hartig, les granules de polyphosphates sont présents. x 30000


Printemps
Automne
Hiver
1
h
c
Me
h
c
Mi
T
h
cc
RH
cc
RH
cc
x 3300
2
Mi
pf
x 30000
3
Mi
pf
c
x 11200
4
gl
RH
cc
x 11200
5
RH
x 30000
6
Mi
gl
pf
x 30000
7
Mi
gl
pf
x 14400
8
RH
gl
pf
pv
cc
x 12000
9
Mi
x 30000
10
gl
Mi
T
pf
x 7000
11
RH
gl
x 30000

ETUDE CYTOCHIMIQUE DES MYCORHIZES NATURELLES DE *Fagus sylvatica* L. EN ASSOCIATION AVEC *Lactarius subdulcis* Fr., ss. Q., Lange

Site de prélèvement : **site de la Crédence, rendzine brunifiée.**

Période de prélèvement : **printemps, automne, hiver 1996.**

Mise en évidence des polysaccharides par le test PATAg

Abréviations : h : hyphe ; T : composés polyphénoliques ; L : laticifère ; c : ciment ; cc : cellule corticale ; RH : réseau de Hartig ; p : parenchyme ; j : jonction cellulaire ; x : vaisseaux xylémiens ; flèches : glycogène ; pv : paroi végétale ; pf : paroi fongique.

Au printemps, dans le manteau interne et au niveau du réseau de Hartig, les parois des hyphes et les ciments ainsi que les parois des cellules corticales voisines du réseau sont peu marqués. En revanche, le glycogène cytoplasmique est très réactif. Un faible marquage est observé dans les structures du cortex profond.

Figure 1 : Structures du manteau interne des mycorhizes. x 4400

Figure 5 : Détail du réseau de Hartig. x 20000.

Figure 8 : Détail du cortex profond des mycorhizes. x 4400

A l'automne, les parois des hyphes du manteau externe sont peu marquées alors que celles des hyphes du manteau interne ainsi que le ciment qui les lie le sont fortement. Le marquage au niveau du réseau de Hartig est faible, excepté au niveau du glycogène fongique et du cytoplasme des cellules corticales voisines. Les structures du cortex profond sont peu marquées. Dans le cylindre central, les jonctions cellulaires et les parois des cellules du parenchyme sont faiblement réactives et aucun marquage de la paroi des vaisseaux n'est observé.

Figure 2 : Portion du manteau externe mycorhizien. x 20000

Figure 3 : Région du manteau interne des mycorhizes. x 20000

Figure 6 : Détail du réseau de Hartig. x 20000

Figure 9 : Cortex profond de la mycorhize. x 20000

Figure 11 : Détail du cylindre central mycorhizien. x 20000

En hiver, les structures du manteau interne sont peu marquées exception faite du glycogène fongique. Au niveau du réseau de Hartig, les parois des deux partenaires réagissent positivement. En revanche, les parois des cellules corticales du cortex profond et les jonctions cellulaires ne sont pas marquées. Dans le cylindre central, les parois des cellules du parenchyme et les jonctions cellulaires sont réactives.

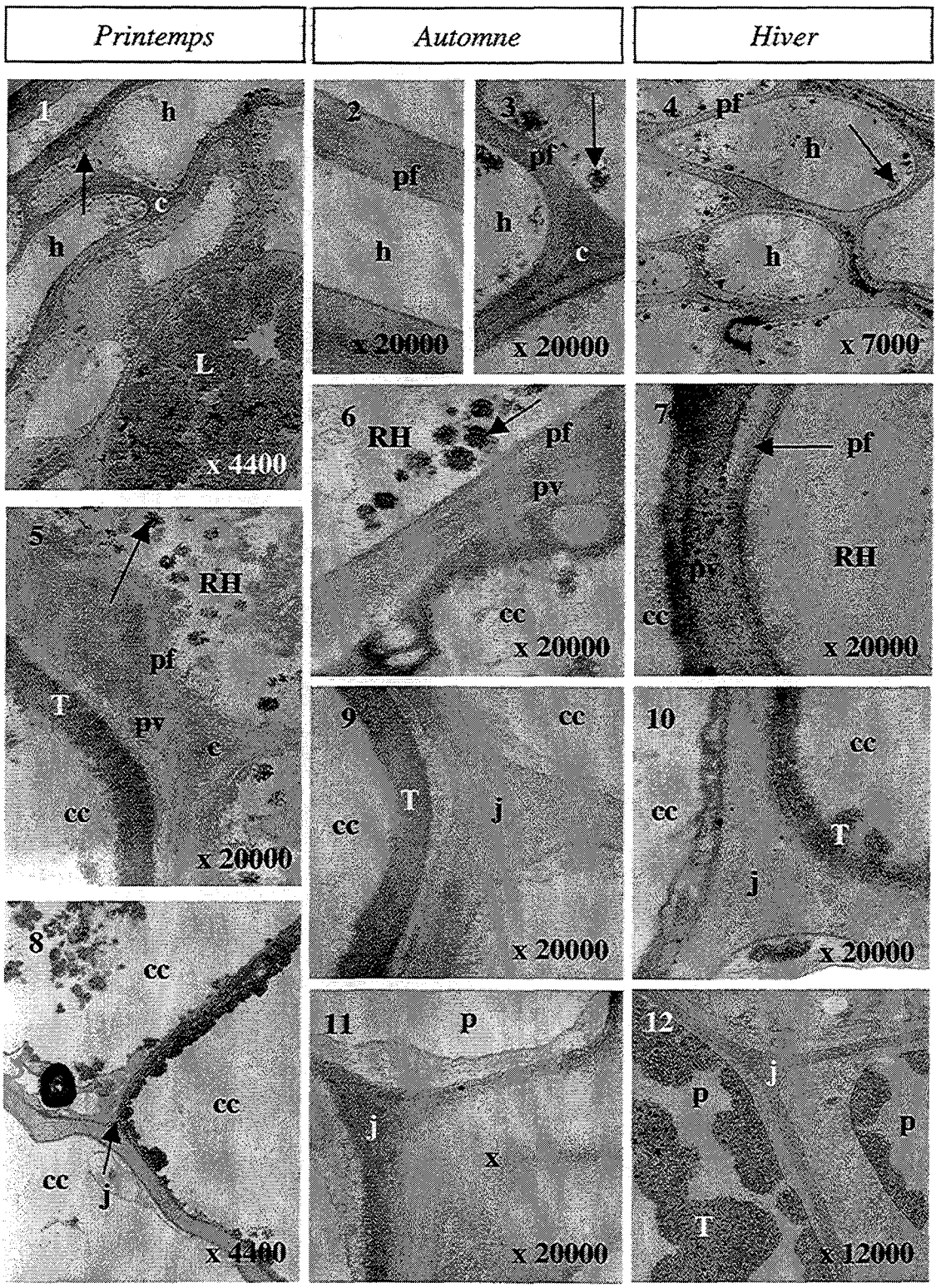
Figure 9 : Région du manteau fongique. x 7000

Figure 10 : Détail du réseau de Hartig. x 20000

Figure 11 : Portion du cortex d'une mycorhize. x 20000

Figure 12 : Cylindre central mycorhizien. x 12000

PLANCHE XXV


Printemps
Automne
Hiver
1
h
c
h
L
x 4400
2
pf
h
x 20000
3
pf
h
c
x 20000
4
pf
h
h
x 7000
5
RH
pf
T
pv
c
cc
x 20000
6
RH
pf
pv
cc
x 20000
7
pf
pv
RH
cc
x 20000
8
cc
cc
cc
j
x 4400
9
cc
T
j
cc
x 20000
10
cc
cc
T
j
x 20000
11
p
j
x
x 20000
12
j
p
p
T
x 12000

ETUDE CYTOCHIMIQUE
DES MYCORHIZES NATURELLES DE *Fagus sylvatica* L.
EN ASSOCIATION AVEC *Lactarius subdulcis* Fr., ss. Q., Lange

Site de prélèvement : **site de la Crédence, rendzine brunifiée.**

Période de prélèvement : **printemps, automne, hiver 1996.**

Mise en évidence des protéines riches en cystine par le réactif de Gomori-Swift

Abréviations : h : hyphe ; T : composés polyphénoliques ; c : ciment ; cc : cellule corticale ; RH : réseau de Hartig ; p : parenchyme ; j : jonction cellulaire ; x : vaisseaux xylémiens ; têtes de flèches : globules azotés ; pf : paroi fongique ; pv : paroi végétale.

Au printemps, dans le manteau interne, les parois des hyphes sont peu marquées. En revanche, le ciment interhyphal, le cytoplasme des hyphes et les globules fongiques vacuolaires réagissent positivement. De même, au niveau du réseau de Hartig, les parois des deux partenaires sont peu réactives alors que le ciment est très fortement marqué. Un faible marquage est observé dans les structures du cortex profond et du cylindre central.

Figure 1 : Structures du manteau interne des mycorhizes. x 2800
Figure 6 : Région du réseau de Hartig. x 3000.
Figure 9 : Détail du cortex profond des mycorhizes. x 2800
Figure 12 : Cylindre central mycorhizien. x 3200

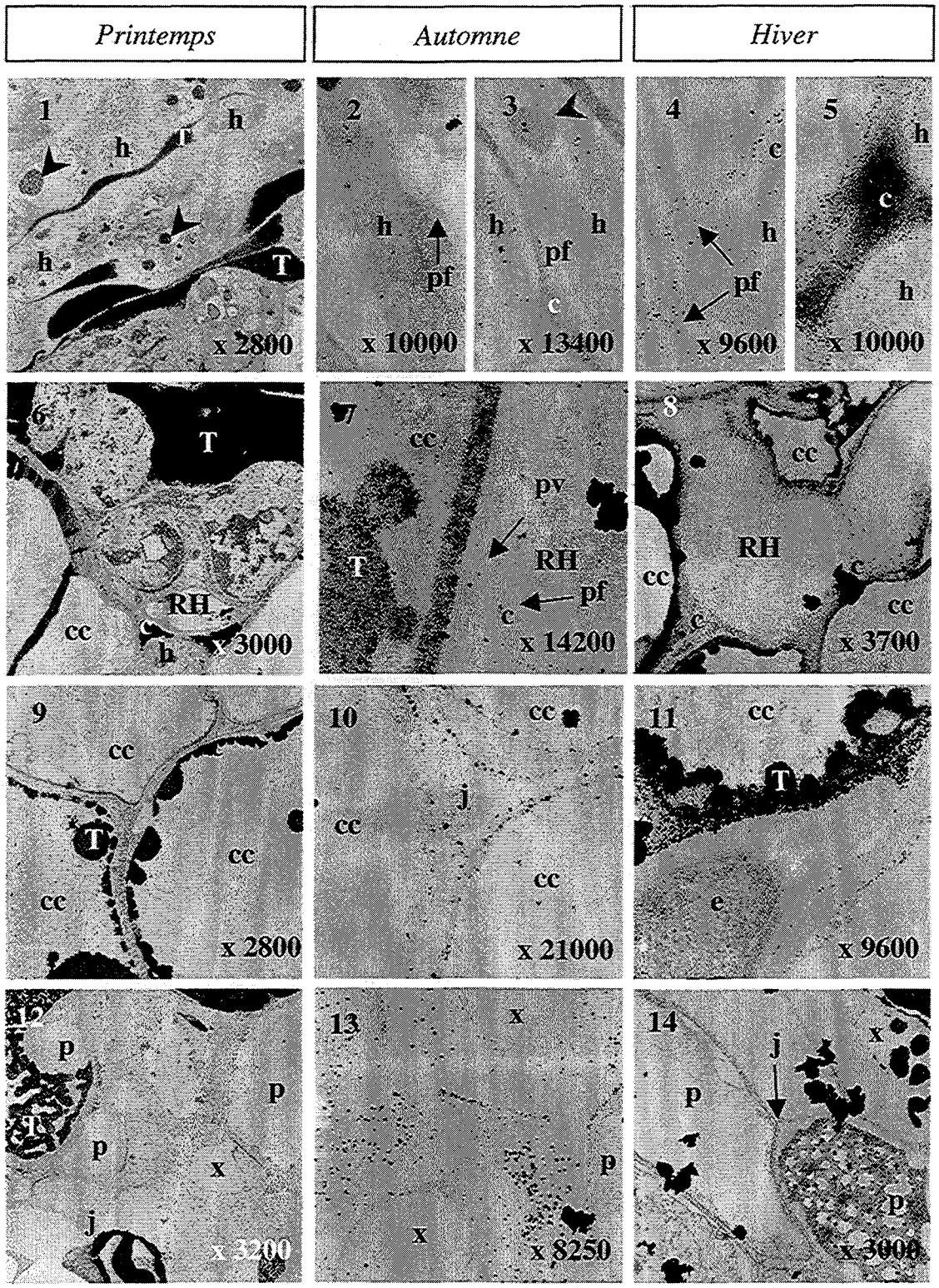
A l'automne, les parois des hyphes réagissent faiblement au réactif de Swift alors que le cytoplasme des hyphes du manteau externe est marqué. Il en est de même au niveau du réseau de Hartig, exception faite des polyphénols présents dans les vacuoles des cellules corticales voisines. Un faible marquage est observé au niveau des structures du cortex profond et du cylindre central.

Figure 2 : Portion du manteau externe mycorhizien. x 10000
Figure 3 : Région du manteau interne des mycorhizes. x 13400
Figure 7 : Détail du réseau de Hartig. x 14200
Figure 10 : Cortex profond de la mycorhize. x 21000
Figure 13 : Détail du cylindre central mycorhizien. x 2850

En hiver, le manteau externe montre un marquage presque inexistant alors dans le manteau interne, le ciment est très réactif et les parois fongiques le sont moins. Au niveau du réseau de Hartig, les parois des deux partenaires réagissent faiblement. En revanche, les parois des cellules corticales du cortex profond sont fortement marquées. Les parois des cellules endodermiques ne réagissent pas. Dans le cylindre central, les parois des cellules du parenchyme et les jonctions cellulaires sont réactives alors que la paroi épaissie des vaisseaux ne l'est pas.

Figure 4 : Région du manteau externe. x 9600
Figure 5 : Détail du manteau interne. x 10000
Figure 8 : Portion du réseau de Hartig. x 3700
Figure 11 : Portion du cortex et de l'endoderme d'une mycorhize. x 9600
Figure 14 : Cylindre central mycorhizien. x 3000

PLANCHE XXVI



ETUDE ULTRASTRUCTURALE DES RACINES PORTEUSES DE MYCORHIZES DE *Fagus sylvatica* L.

Site de prélèvement : **site de la Crédence, rendzine brunifiée.**

Période de prélèvement : **printemps, automne, hiver 1996.**

Double coloration acétate d'uranyle – citrate de plomb

Abréviations : hi : hyphe intracellulaire ; cc : cellule corticale ; T : composés polyphénoliques ; ep : épaississement pariétal ; e : endoderme ; flèche : couche de silice ; S : suber ; Ca : cambium ; x : xylème ; p : parenchyme médullaire.

Figure 1 : Au printemps, le cortex des racines porteuses est dégénérescent et renferme des hyphes intracellulaires. x 7500

Figure 2 : A l'automne, le cortex racinaire contient également des hyphes intracellulaires et un épaississement pariétal important est observé au niveau des cellules corticales. x 7000

Figure 3 : Pendant l'hiver, l'organisation du cortex racinaire est similaire à celle des organes prélevés pendant les saisons précédentes. x 7000

Figure 4 : Echantillons printaniers. Les cellules de l'endoderme sont remplies de composés polyphénoliques et une bande de silice se forme contre la paroi interne des cellules. x 12000

Figure 5 : Dans les échantillons prélevés à l'automne, les cellules du suber sont remplies de polyphénols. La paroi interne des cellules du suber est marquée par la présence d'une bande de silice. x 12000

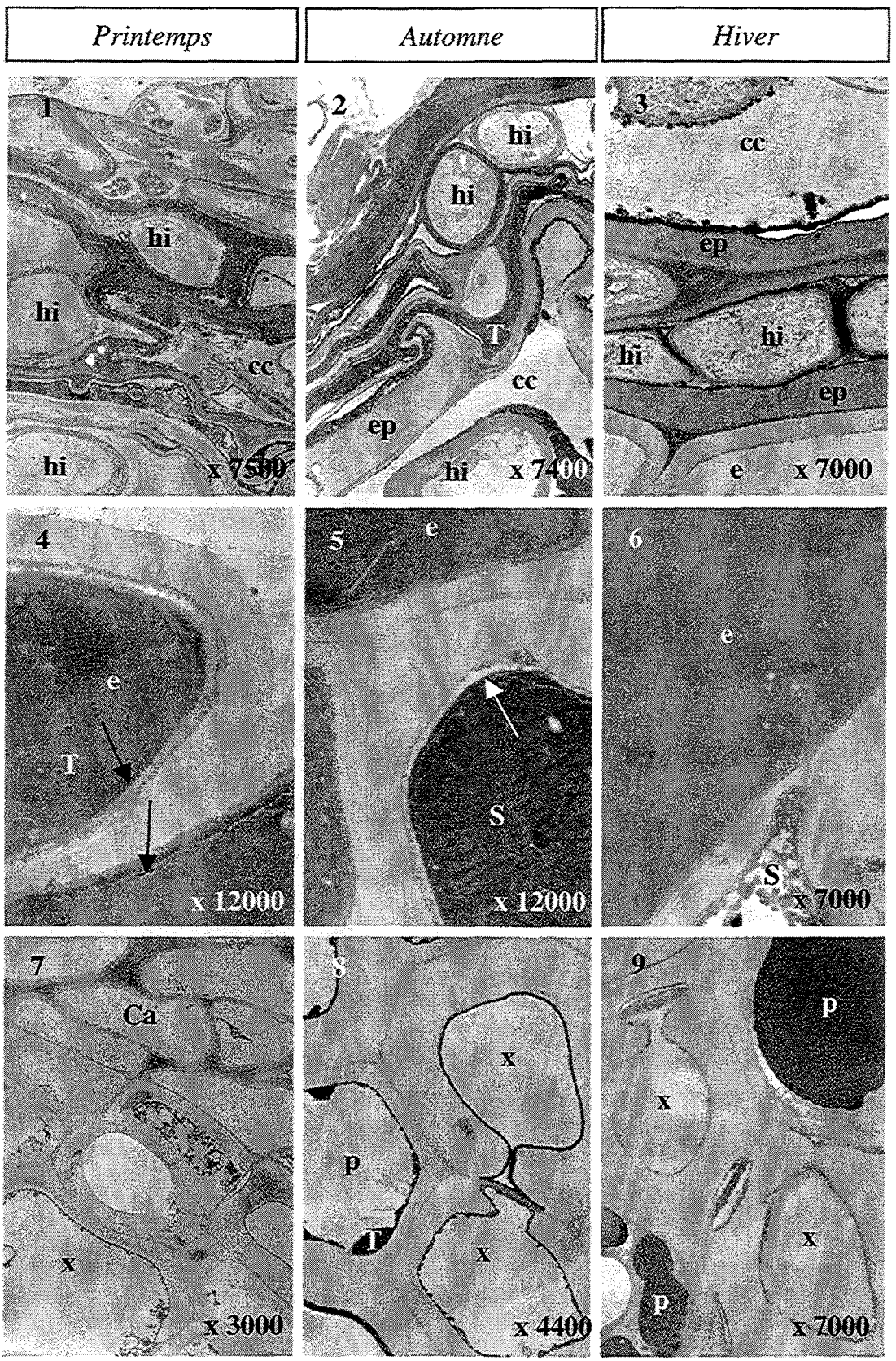
Figure 6 : Echantillons hivernaux. Lorsque le cortex est encore en relation avec l'endoderme, la paroi interne des cellules endodermiques ne présente pas la bande de silice. x 7000

Figure 7 : Récolte printanière. Du cambium met en place du xylème secondaire. x 3000

Figure 8 : Pendant l'automne, les cellules du parenchyme médullaire produisent des composés polyphénoliques en faible quantité. Le liseré pariétal bordant la cavité des vaisseaux xylémiens est très dense. x 4400

Figure 9 : Détail du cylindre central des racines porteuses de mycorhizes en hiver. Les cellules du parenchyme stockent en abondance des polyphénols. x 7000

PLANCHE XXVII



ETUDE CYTOCHIMIQUE
DES RACINES PORTEUSES DE MYCORHIZES
DE *Fagus sylvatica* L.

Site de prélèvement : **site de la Crédence, rendzine brunifiée.**

Période de prélèvement : **printemps, automne, hiver 1996.**

Mise en évidence des polysaccharides par le test PATAg

Abréviations : hi : hyphe intracellulaire ; T : composés polyphénoliques ; cc : cellule corticale ; ep : épaississement pariétal ; e : endoderme ; S : suber ; p : parenchyme ; j : jonction cellulaire ; px : paroi des vaisseaux xylémiens.

Au printemps, le cortex renferme des hyphes intracellulaires dont la paroi est réactive au test PATAg. En revanche, la paroi des cellules corticales est peu marquée.

Figure 1 : Détail du cortex d'une racine porteuse. x 4400

Figure 4 : Région du cylindre central. x 4400.

A l'automne, les structures du cortex sont peu réactives. Dans le cylindre central, les parois des cellules du parenchyme, les jonctions cellulaires et le liseré pariétal bordant la cavité des vaisseaux xylémiens sont marqués alors que la paroi épaissie des vaisseaux l'est moins.

Figure 2 : Portion du cortex racinaire. x 12000

Figure 5 : Région du cylindre central de la racine porteuse. x 12000

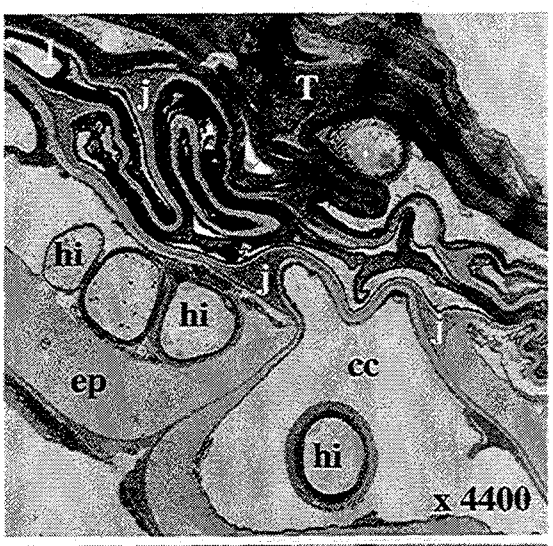
En hiver, les parois cellulaires de l'endoderme et du suber ne sont pas marquées par le test PATAg. Au niveau du cylindre central, les jonctions cellulaires sont peu marquées. Les parois des cellules du parenchyme le sont plus.

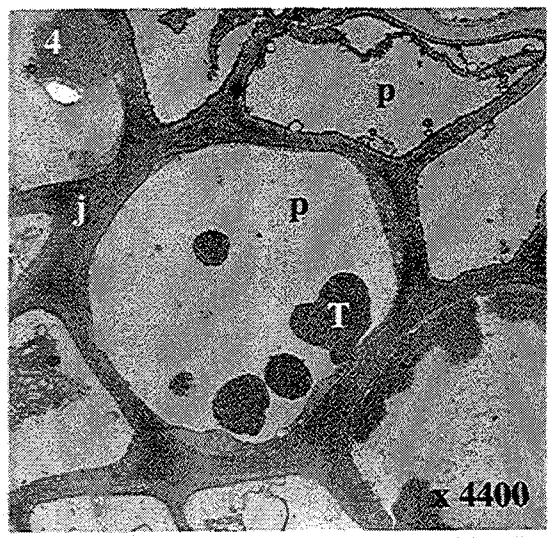
Figure 3 : Région de l'endoderme et du suber. x 4400

Figure 6 : Détail du cylindre central. x 20000

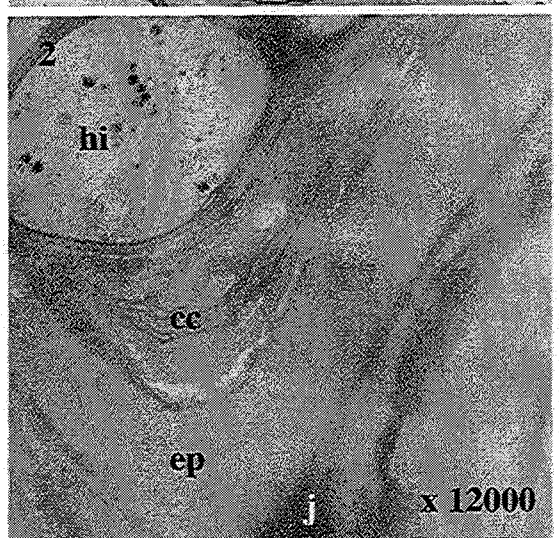
PLANCHE XXVIII

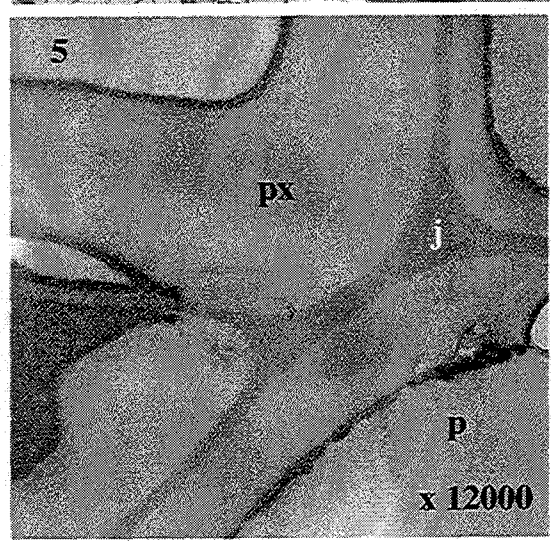
Printemps



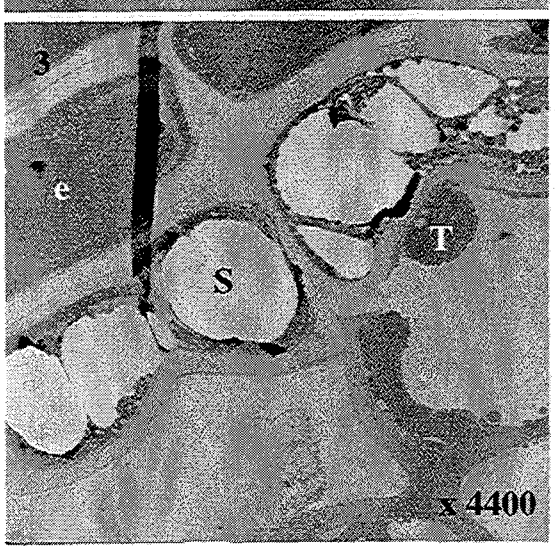


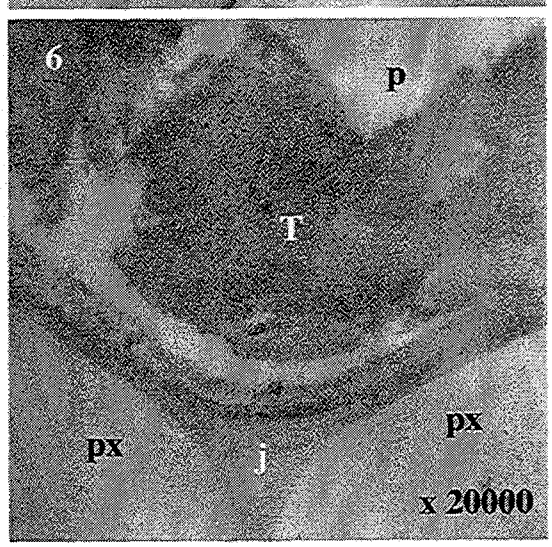
Automne





Hiver





ETUDE CYTOCHIMIQUE
DES RACINES PORTEUSES DE MYCORHIZES
DE *Fagus sylvatica* L.

Site de prélèvement : **site de la Crédence, rendzine brunifiée.**

Période de prélèvement : **printemps, automne, hiver 1996.**

Mise en évidence des protéines riches en cystine par le réactif de Gomori-Swift

Abréviations : hi : hyphe intracellulaire ; T : composés polyphénoliques ; cc : cellule corticale ; ep : épaississement pariétal ; e : endoderme ; p : parenchyme ; j : jonction cellulaire ; px : paroi des vaisseaux xylémiens ; ze : zone externe ; zi : zone interne.

Au printemps, la paroi des cellules du cortex est répond positivement au réactif de Swift. Celle des cellules endodermiques n'est pas marquée. En revanche, les jonctions cellulaires sont fortement réactives et un marquage est également observé au niveau des composés polyphénoliques des cellules endodermiques. Dans le cylindre central, les parois épaissies des vaisseaux du xylème se divisent en une couche externe non marquée et une couche interne réactive. Les parois des cellules du parenchyme sont fortement réactives, de même que le cytoplasme de ces cellules. Le marquage le plus intense est observé dans les jonctions cellulaires.

Figure 1 : Portion d'une cellule du cortex d'une racine porteuse. x 17500

Figure 4 : Détail de l'endoderme. x 12000.

Figure 5 : Détail du cylindre central d'une racine porteuse de mycorhizes. x 12000.

A l'automne, les structures du cortex sont peu réactives. La paroi des hyphes intracellulaires présentes dans les cellules corticales peut être très réactive. Dans le cylindre central, les parois des cellules du parenchyme sont fortement marquées. Le marquage est plus intense a été observé au niveau des jonctions cellulaires et du liseré pariétal qui borde la cavité des vaisseaux. La paroi de ces derniers se divise en une zone externe peu réactive et en une zone interne qui l'est plus.

Figure 2 : Portion du cortex racinaire. x 20000

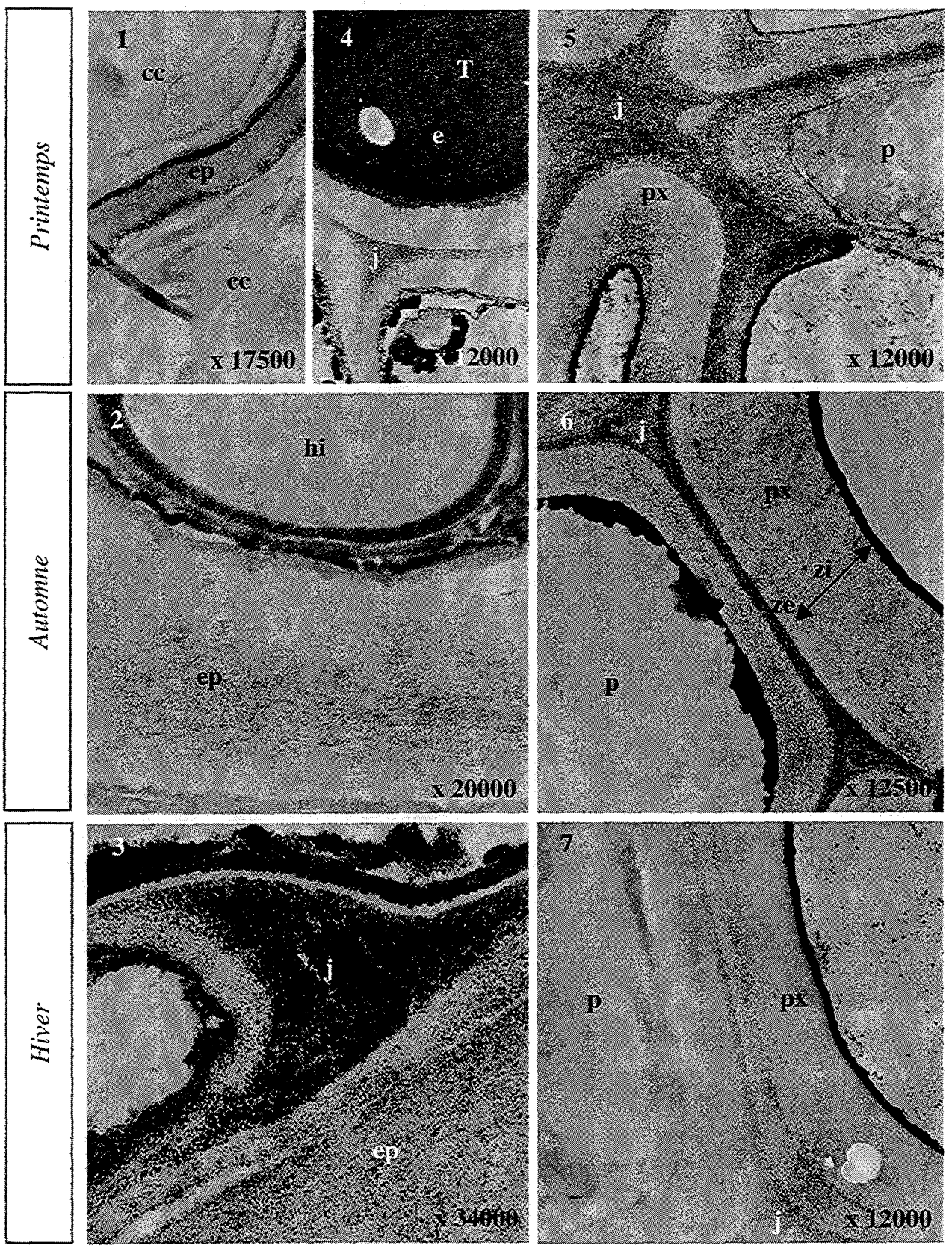
Figure 6 : Région du cylindre central de la racine porteuse. x 12500

En hiver, les jonctions cellulaires du cortex sont intensément marquées alors que la paroi des cellules corticales l'est moins. Au niveau du cylindre central, un léger marquage a été observé au niveau des jonctions cellulaires. La paroi des vaisseaux se divise en deux zones comme à l'automne mais le marquage est plus discret. Le liseré bordant leur cavité est très réactif.

Figure 3 : Région du cortex racinaire. x 34000

Figure 7 : Détail du réseau de Hartig. x 12000

PLANCHE XXIX



ETUDE ULTRASTRUCTURALE DES MYCORHIZES NATURELLES DE *Fagus sylvatica* L. EN ASSOCIATION AVEC *Cenococcum geophilum* L.

Site de prélèvement : **site de Bezange, sol podzolique.**

Période de prélèvement : **printemps, automne, hiver 1996.**

Coloration par le bleu de toluidine (Figures 1 à 3) et
double coloration acétate d'uranyle – citrate de plomb (Figures 4 à 11)

Figure 1 : En hiver, *Cenococcum geophilum* élabore des ectomycorhizes. M : manteau ; têtes de flèches : réseau de Hartig ; c : cortex ; T : composés polyphénoliques ; e : endoderme ; Cc : cylindre central. x 760

Figure 2 : Au printemps, *Cenococcum geophilum* forme des mycorhizes ne montrant pas de réseau de Hartig mais des hyphes intracellulaires (flèches). Cc : cylindre central ; c : cortex ; T : composés polyphénoliques. x 256

Figure 3 : A l'automne, les mycorhizes de *Cenococcum geophilum* s'apparentent à des ectendomycorhizes. T : composés polyphénoliques ; c : cortex ; M : manteau ; Cc : cylindre central ; e : endoderme ; flèche : hyphe intracellulaire. x 576

Figure 4 : Au printemps, des globules azotés (têtes de flèches) sont observés dans les vacuoles des hyphes (h) du manteau. c : ciment. x 4400

Figure 5 : Au printemps, les hyphes intracellulaires (hi) contiennent des globules azotés (tête de flèche). cc : cellule corticale. x 3000

Figure 6 : A l'automne, des granules de polyphosphates (flèche) sont présents dans les hyphes intracellulaires (hi). cc : cellule corticale. pv : paroi végétale ; pf : paroi fongique. x 37500

Figure 7 : Dans les échantillons hivernaux, le manteau des mycorhizes est vivant. Des globules azotés (**Figure 7a**, x 2000) sont présents dans les vacuoles des hyphes (h). c : ciment ; tête de flèche : globule azoté. x 3400

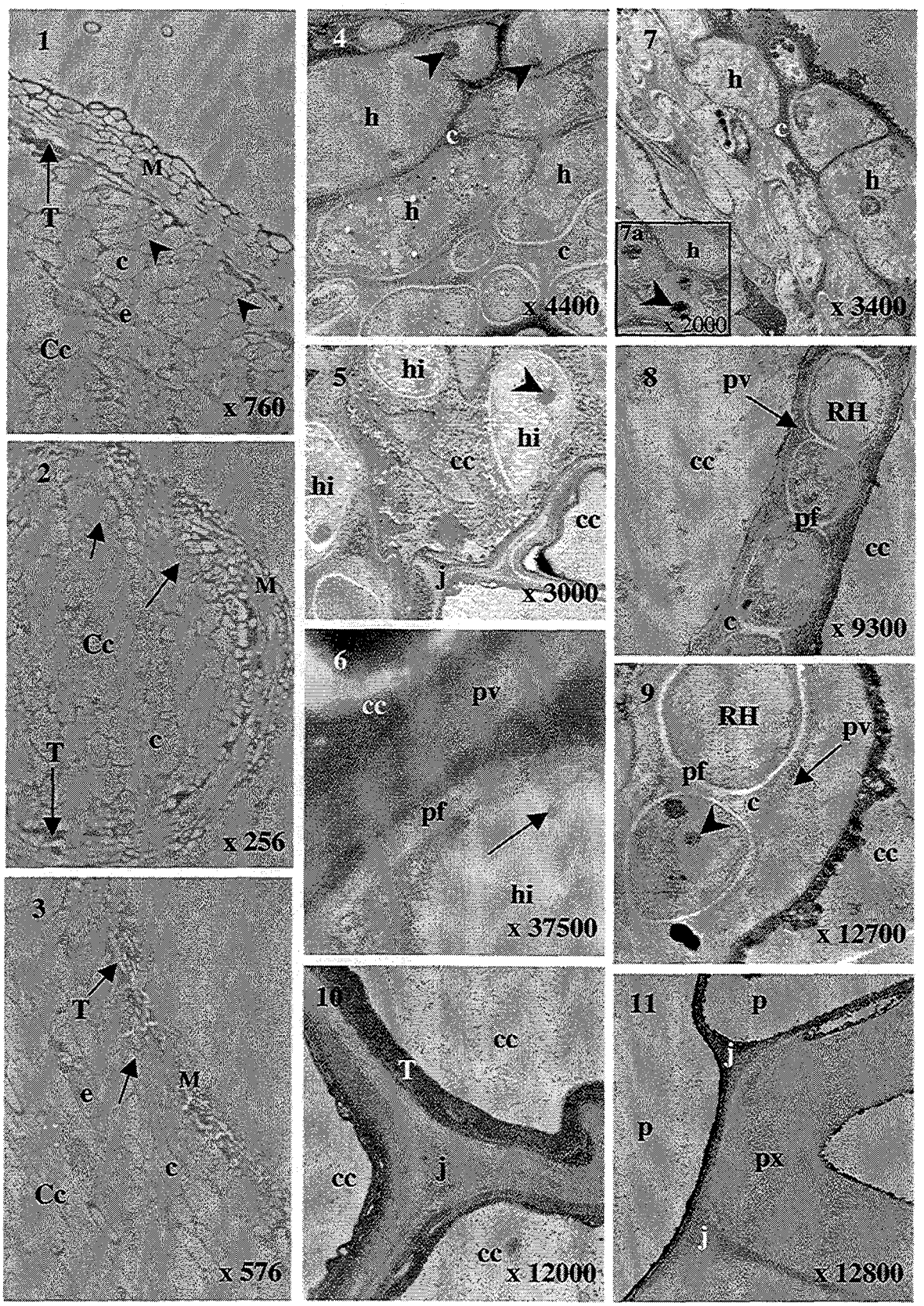
Figure 8 : Détail du réseau de Hartig (RH) observé dans les échantillons en hiver. cc : cellule corticale. c : ciment ; pv : paroi végétale ; pf : paroi fongique. x 9300

Figure 9 : En hiver, des globules azotés (tête de flèche) sont présents dans les vacuoles des hyphes du réseau de Hartig (RH). cc : cellule corticale ; pv : paroi végétale ; pf : paroi fongique. x 12700

Figure 10 : Détail du cortex racinaire de la mycorhize en hiver. cc : cellule corticale ; j : jonctions cellulaires ; T : composés polyphénoliques. x 12000

Figure 11 : Région du cylindre central mycorhizien en hiver. j : jonctions cellulaires ; p : parenchyme ; px : paroi xylémienne. x 12800

PLANCHE XXX


1
T
M
c
e
Cc
x 760
2
M
Cc
T
c
x 256
3
T
e
M
c
Cc
x 576
4
h
c
h
h
c
x 4400
5
hi
hi
cc
hi
cc
j
x 3000
6
cc
pv
pf
hi
x 37500
7
h
c
h
7a
h
x 2000
x 3400
8
pv
RH
cc
pf
cc
c
x 9300
9
RH
pv
pf
c
cc
x 12700
10
cc
T
cc
j
cc
x 12000
11
p
j
p
px
j
x 12800

ETUDE CYTOCHIMIQUE
DES MYCORHIZES NATURELLES DE *Fagus sylvatica* L.
EN ASSOCIATION AVEC *Cenococcum geophilum* L.

Site de prélèvement : **site de Bezange, sol podzolique.**

Période de prélèvement : **printemps, automne, hiver 1996.**

Mise en évidence des polysaccharides par le test PATAg

Abréviations : h : hyphe ; hi : hyphe intracellulaire ; T : composés polyphénoliques ; c : ciment ; cc : cellule corticale ; RH : réseau de Hartig ; p : parenchyme ; j : jonction cellulaire ; px : paroi des vaisseaux xylémiens ; tête de flèche : globule azoté ; flèche : glycogène ; pv : paroi végétale ; pf : paroi fongique.

Au printemps, dans le manteau interne, les parois des hyphes sont peu marquées alors que le ciment interhyphal l'est fortement. De même, au niveau de la zone d'échange, les parois des deux partenaires sont peu réactives. En revanche, le glycogène fongique est fortement marqué. Un faible marquage est observé dans les structures du cortex profond.

Figure 1 : Structures du manteau interne des mycorhizes. x 9800

Figure 4 : Détail des hyphes intracellulaires présentes dans les cellules corticales superficielles. x 9500.

Figure 7 : Détail du cortex profond des mycorhizes. x 16000

A l'automne, les parois des hyphes du manteau interne sont marquées. Le ciment interhyphal montre un marquage d'intensité similaire. Les parois des hyphes intracellulaires sont peu réactives de même que les parois des cellules corticales. Les structures du cortex profond ne sont pas marquées. Dans le cylindre central, les jonctions cellulaires et les parois des cellules du parenchyme sont peu réactives, celles des vaisseaux ne le sont pas.

Figure 2 : Portion du manteau interne mycorhizien. x 8600

Figure 5 : Région de la zone d'échange. x 13600

Figure 8 : Détail du cortex profond des mycorhizes. x 13800

Figure 10 : Détail du cylindre central mycorhizien. x 14500

En hiver, les structures du manteau interne sont très réactives. Au niveau du réseau de Hartig, les parois des hyphes ne sont pas marquées alors que celles des cellules corticales voisines le sont plus. Les parois des cellules du cortex profond et les jonctions cellulaires ne sont pas marquées. Dans le cylindre central, le marquage est peu intense.

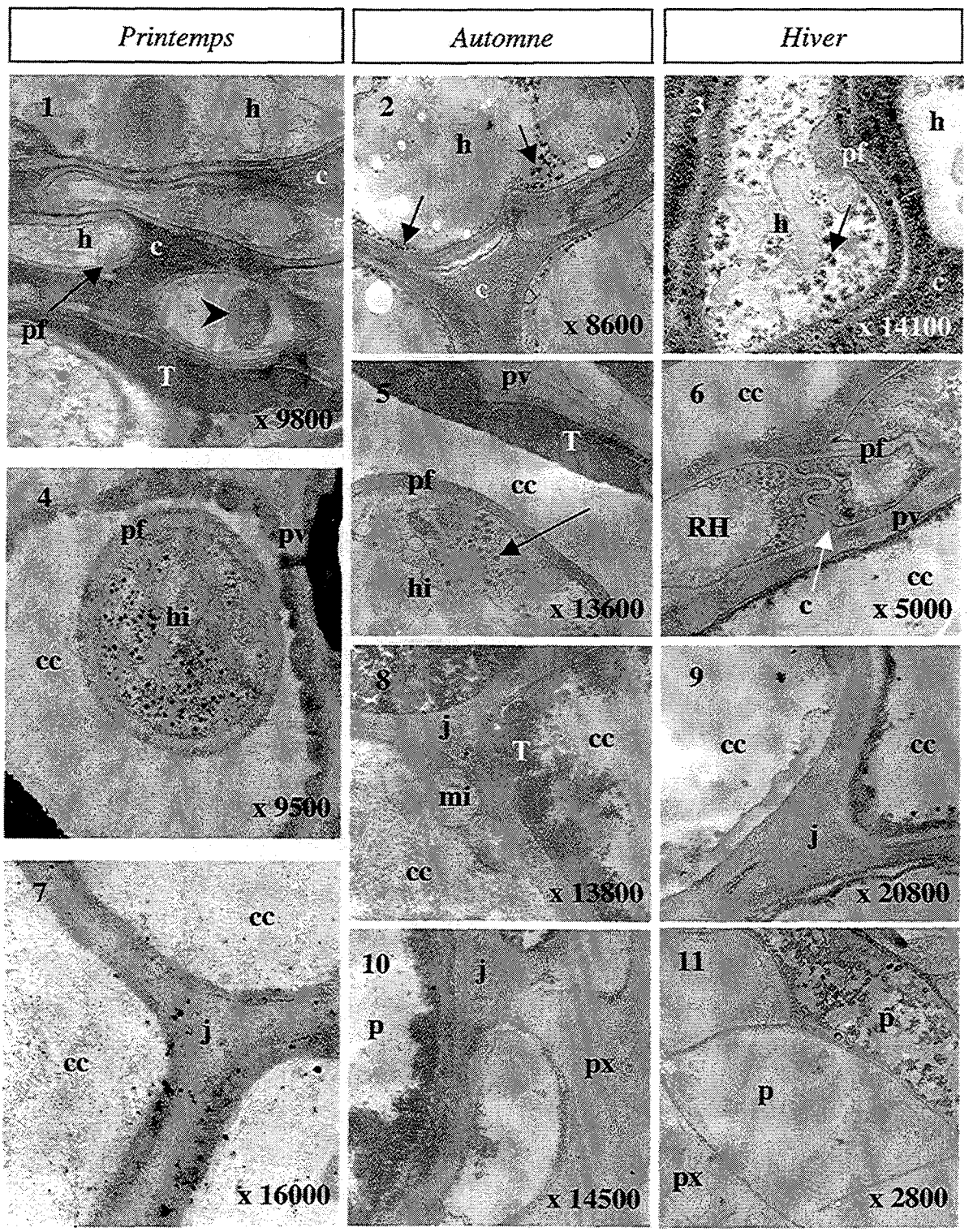
Figure 8 : Région du manteau fongique. x 14100

Figure 9 : Détail du réseau de Hartig. x 5000

Figure 10 : Portion du cortex profond d'une mycorhize. x 20800

Figure 11 : Cylindre central mycorhizien. x 2800

PLANCHE XXXI



ETUDE CYTOCHIMIQUE
DES MYCORHIZES NATURELLES DE *Fagus sylvatica* L.
EN ASSOCIATION AVEC *Cenococcum geophilum* L.

Site de prélèvement : **site de Bezange, sol podzolique.**

Période de prélèvement : **printemps, automne, hiver 1996.**

Mise en évidence protéines riches en cystine par le réactif de Gomori-Swift

Abréviations : h : hyphe ; hi : hyphe intracellulaire ; T : composés polyphénoliques ; c : ciment ; cc : cellule corticale ; RH : réseau de Hartig ; p : parenchyme ; j : jonction cellulaire ; px : paroi des vaisseaux xylémiens ; tête de flèches : globules azotés ; pv : paroi végétale ; pf : paroi fongique.

Au printemps, l'ensemble des structures fongiques et racinaires des mycorhizes de *Cenococcum geophilum* réagissent très fortement au réactif de Swift exception faite du manteau qui présente un marquage plus faible.

Figure 1 : Structures du manteau mycorhizien. x 5900

Figure 4 : Détail des hyphes intracellulaires présentes dans les cellules corticales superficielles. x 5300.

Figure 7 : Détail du cortex profond des mycorhizes. x 9000

Figure 10 : Région du cylindre central des mycorhizes. x 5900

A l'automne, les parois des hyphes du manteau interne ne sont pas marquées. En revanche, leur cytoplasme est réactif. Il en est de même du ciment interhyphal. Les parois des hyphes intracellulaires et celles des cellules corticales réagissent négativement au réactif de Swift. Les structures du cortex profond ne sont pas marquées.

Figure 2 : Portion du manteau interne mycorhizien. x 247500

Figure 5 : Région de la zone d'échange. x 17200

Figure 8 : Détail du cortex profond des mycorhizes. x 15000

En hiver, les parois fongiques des hyphes du manteau et du réseau de Hartig ainsi que celles des cellules corticales voisines du réseau sont marquées. Les ciments présentent un marquage très intense. Les parois des cellules du cortex profond et les jonctions cellulaires sont fortement marquées. Dans le cylindre central, le marquage est moins intense.

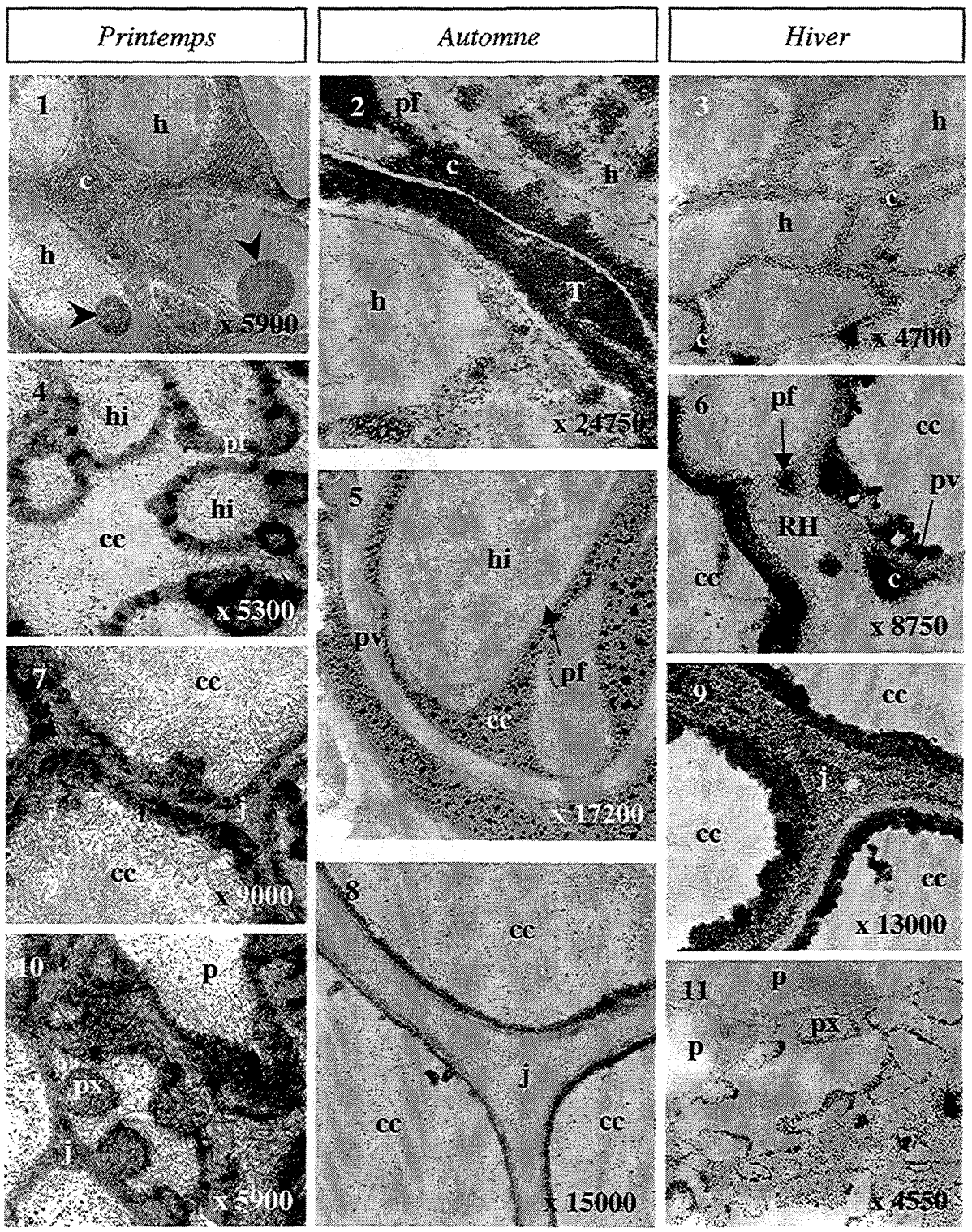
Figure 3 : Région du manteau fongique. x 4700

Figure 6 : Détail du réseau de Hartig. x 8750

Figure 9 : Portion du cortex d'une mycorhize. x 13000

Figure 11 : Cylindre central mycorhizien. x 4550

PLANCHE XXXII



ETUDE ULTRASTRUCTURALE DES MYCORHIZES NATURELLES DE *Fagus sylvatica* L. EN ASSOCIATION AVEC *Lactarius subdulcis* Fr., ss. Q., Lange

Site de prélèvement : **site de Bezange, sol podzolique.**

Période de prélèvement : **printemps, automne, hiver 1996.**

Coloration par le bleu de toluidine (Figure 1) et double coloration acétate d'uranyle – citrate de plomb (Figures 2 à 6)

Figure 1 : Structure ectomycorhizienne des mycorhizes formées par *Lactarius subdulcis* comportant un manteau fongique (M) et un réseau de Hartig (flèche). Le cortex profond (c) et le cylindre central (Cc) sont dépourvu de mycélium. e : endoderme. x 350

Figure 2 : Quartz et silice présents dans le sol à proximité de la surface mycorhizienne. x 7800.

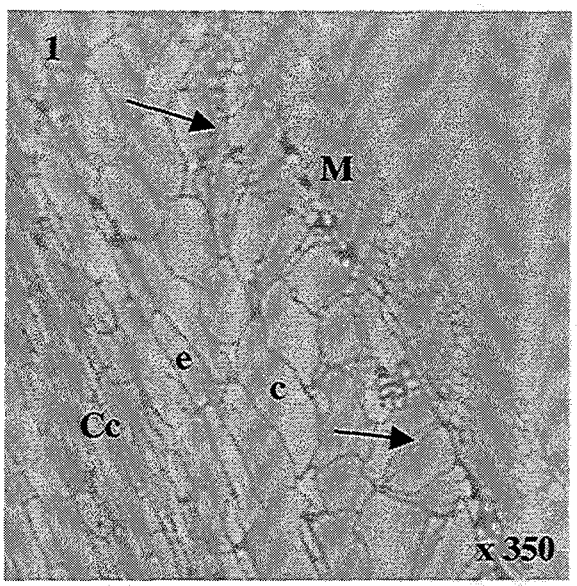
Figure 3 : Récolte printanière. Les hyphes (h) du manteau interne contiennent des granules de polyphosphates (flèches). M : manteau ; v : vacuole. x 33400

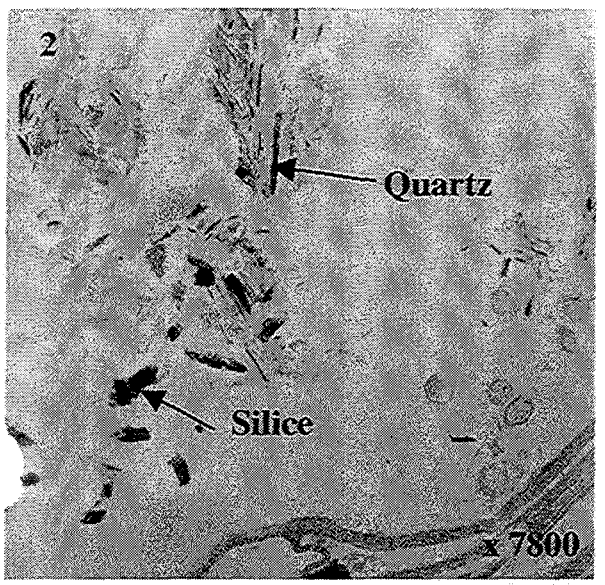
Figure 4 : Au printemps, des globules azotés (têtes de flèches) sont observés dans les vacuoles (v) des hyphes (h) du manteau interne (M). x 21000

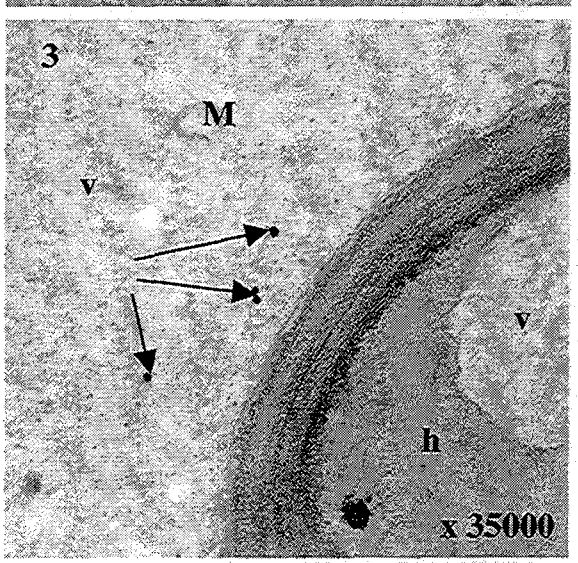
Figure 5 : Dans les échantillons prélevés en hiver, des granules de polyphosphates (flèches) sont présents dans les vacuoles (v) des hyphes du réseau de Hartig (RH). cc : cellule corticale. x 30000

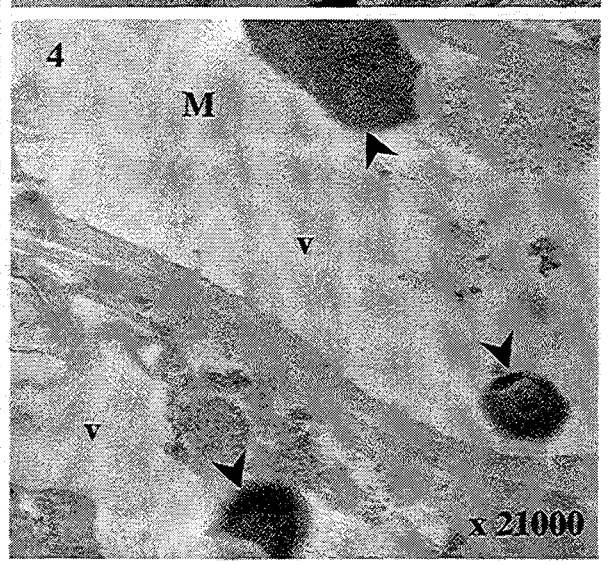
Figure 6 : Pendant l'hiver, des globules azotés (tête de flèche) sont également observés dans les hyphes du réseau de Hartig (RH). cc : cellule corticale. x 17500

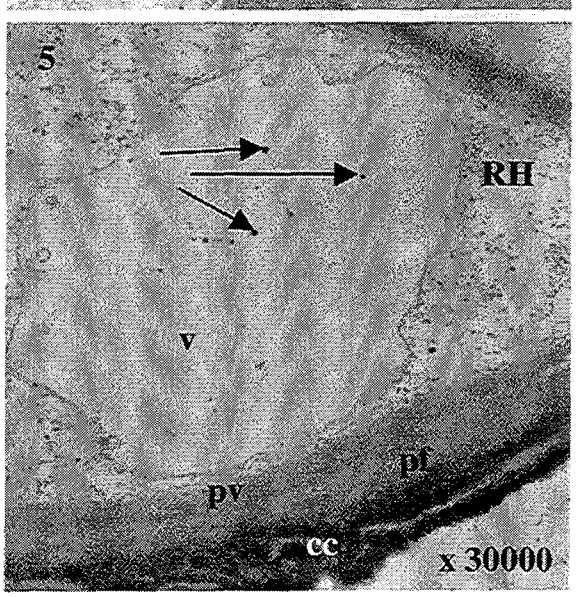
PLANCHE XXXIII

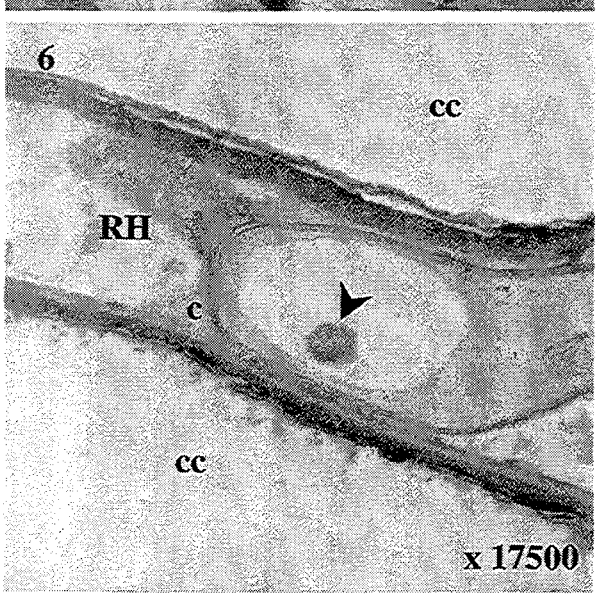












ETUDE CYTOCHIMIQUE
DES MYCORHIZES NATURELLES DE *Fagus sylvatica* L.
EN ASSOCIATION AVEC *Lactarius subdulcis* Fr., ss. Q., Lange

Site de prélèvement : **site de Bezange, sol podzolique.**

Période de prélèvement : **printemps, automne, hiver 1996.**

Mise en évidence des polysaccharides par le test PATAg

Abréviations : h : hyphe ; T : composés polyphénoliques ; c : ciment ; cc : cellule corticale ; RH : réseau de Hartig ; p : parenchyme ; j : jonction cellulaire ; px : paroi des vaisseaux xylémiens ; têtes de flèches : globules azotés ; flèches : glycogène ; pv : paroi végétale ; pf : paroi fongique.

Au printemps, les parois des hyphes du manteau et du réseau de Hartig ainsi que les parois des cellules corticales voisines sont fortement marquées par le test PATAg. Les ciments et le glycogène fongique sont également très réactifs. En revanche, les structures du cortex profond et du cylindre central sont peu marquées.

Figure 1 : Structures du manteau mycorhizien. x 13700

Figure 4 : Détail du réseau de Hartig. x 12700.

Figure 7 : Région de l'endoderme. x 15000

Figure 9 : Région du cylindre central des mycorhizes. x 13700

A l'automne, les parois des hyphes du manteau interne ainsi que le ciment qui les lie sont marqués. Un fort marquage est observé au niveau du glycogène cytoplasmique. Au niveau du réseau de Hartig, les parois des hyphes et celles des cellules corticales voisines présentent un faible marquage. Les structures du cortex profond sont également peu marquées. Dans le cylindre central, les jonctions cellulaires et les parois des cellules du parenchyme répondent positivement au test PATAg. Les parois des vaisseaux sont moins marquées.

Figure 2 : Structures du manteau interne. x 7900

Figure 5 : Détail du réseau de Hartig. x 15800.

Figure 8 : Détail du cortex profond des mycorhizes. x 13750

Figure 11 : Cylindre central mycorhizien. x 14500

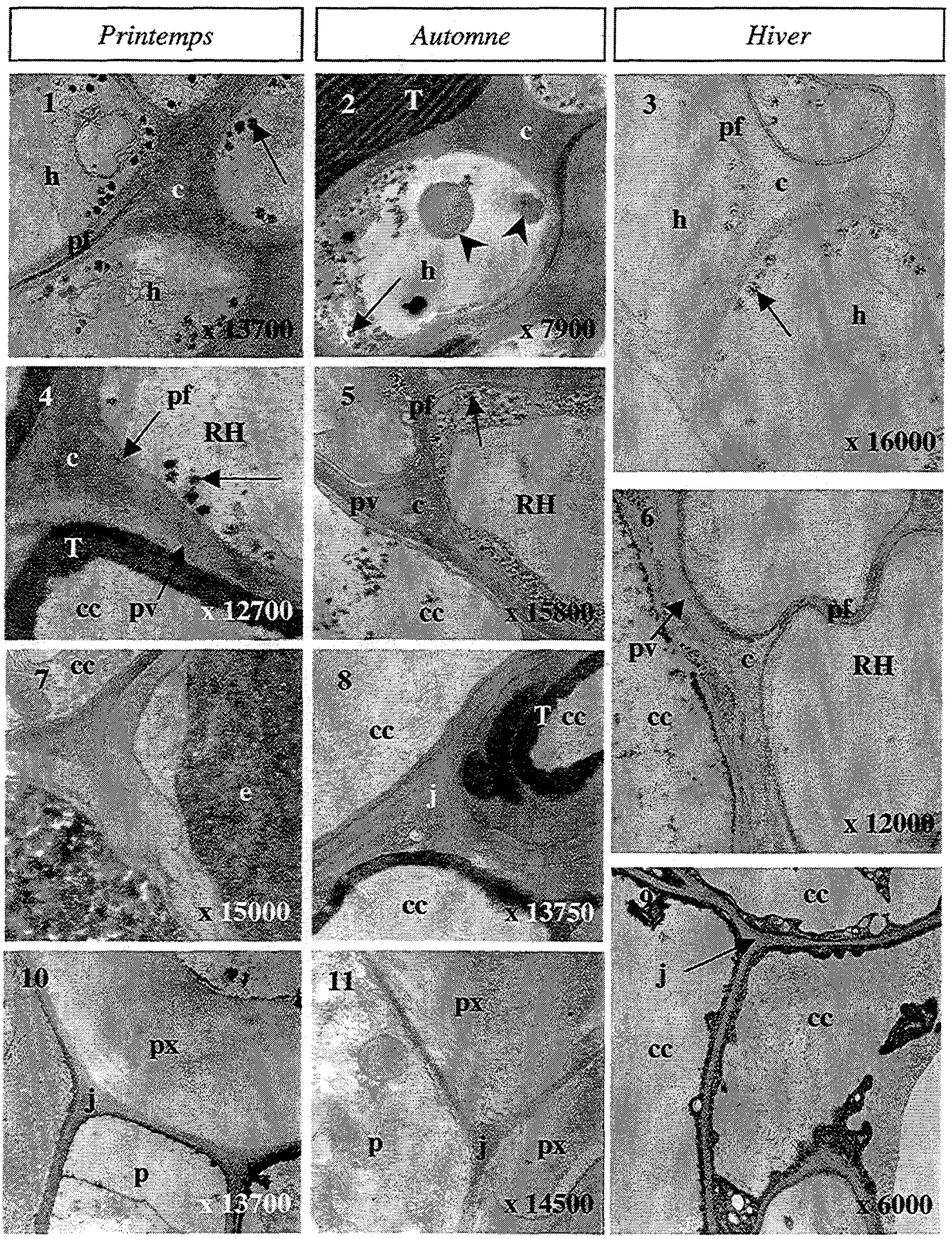
En hiver, les structures fongiques sont peu ou pas réactives. Les parois des cellules corticales voisines du réseau de Hartig sont peu marquées. En revanche, dans le cortex profond, le marquage s'intensifie au niveau des parois et du cytoplasme cellulaires alors que les jonctions cellulaires sont peu réactives.

Figure 3 : Région du manteau fongique. x 16000

Figure 6 : Détail du réseau de Hartig. x 12000

Figure 9 : Portion du cortex d'une mycorhize. x 6000

PLANCHE XXXIV



ETUDE CYTOCHIMIQUE
DES MYCORHIZES NATURELLES DE *Fagus sylvatica* L.
EN ASSOCIATION AVEC *Lactarius subdulcis* Fr., ss. Q., Lange

Site de prélèvement : **site de Bezange, sol podzolique.**

Période de prélèvement : **printemps, automne, hiver 1996.**

Mise en évidence des protéines par le réactif de Gomori - Swift

Abréviations : h : hyphe ; T : composés polyphénoliques ; c : ciment ; cc : cellule corticale ; RH : réseau de Hartig ; p : parenchyme ; j : jonction cellulaire ; px : paroi des vaisseaux xylémiens ; flèche : glycogène ; pv : paroi végétale ; pf : paroi fongique.

A l'automne, les parois des hyphes du manteau ainsi que le ciment qui les lie ne sont pas marqués. En revanche, un fort marquage est observé au niveau du cytoplasme fongique. Au niveau du réseau de Hartig, les parois des hyphes ne présentent aucun marquage alors que les parois des cellules corticales voisines de même que le ciment le sont fortement. Le cortex profond montre également une forte réaction. Dans le cylindre central, les jonctions cellulaires et les parois des cellules du parenchyme sont très réactives. Les parois des vaisseaux sont moins marquées.

Figure 1 : Région du manteau externe. x 8000

Figure 2 : Structures du manteau interne. x 8200

Figure 5 : Détail du réseau de Hartig. x 12500.

Figure 7 : Détail du cortex profond des mycorhizes. x 8900

Figure 9 : Cylindre central mycorhizien. x 8100

En hiver, dans le manteau, les structures fongiques sont peu ou pas réactives excepté le ciment interhyphal du manteau interne qui est très réactif. Au niveau du réseau de Hartig, les parois des hyphes et celles des cellules corticales voisines sont fortement marquées alors que le ciment ne montre aucun marquage. Dans le cortex profond, le marquage est intense au niveau des parois et des jonctions cellulaires. Les structures du cylindre central sont très réactives.

Figure 3 : Région du manteau externe. x 15000

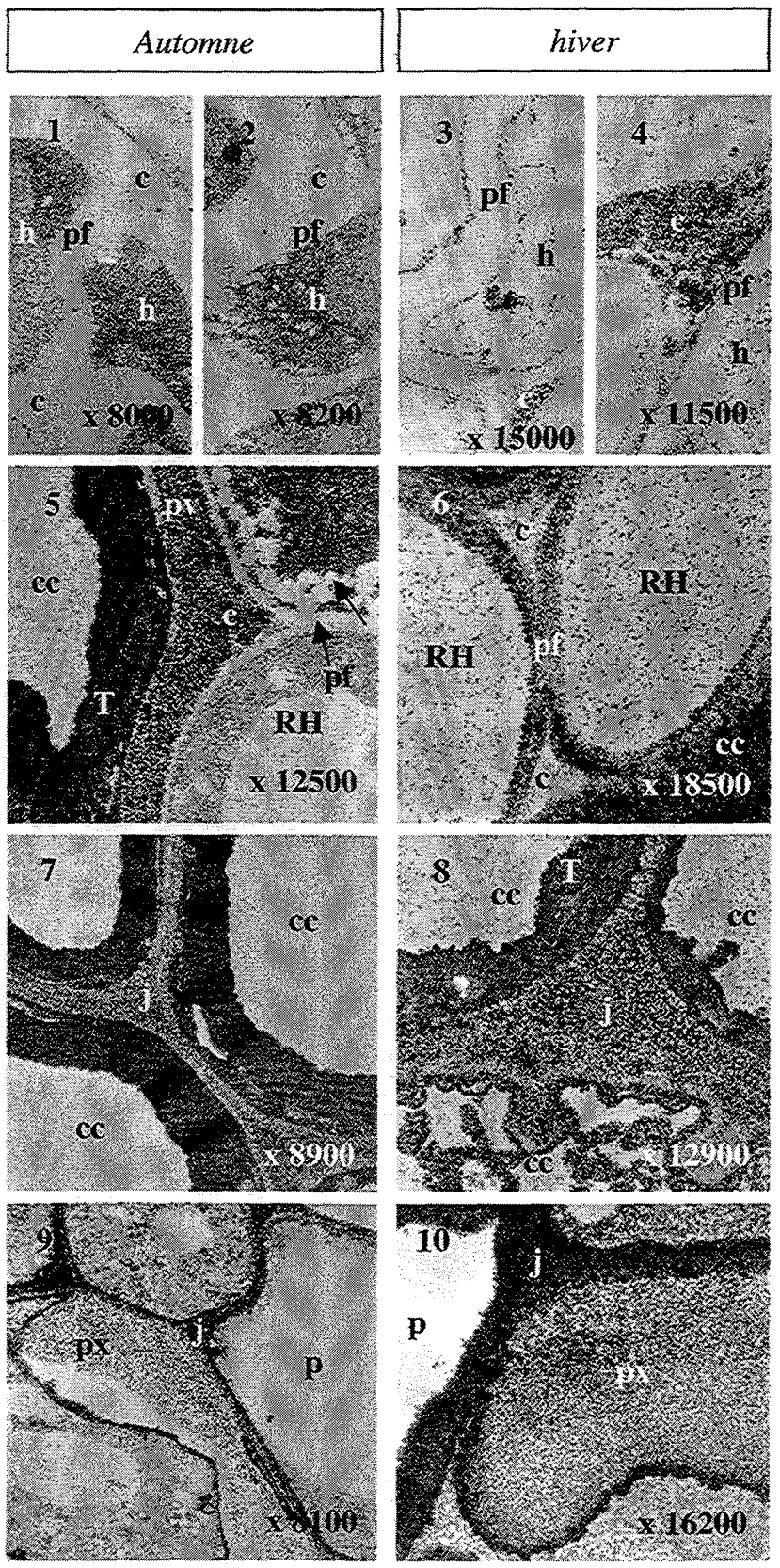
Figure 4 : Détail du manteau interne. x 11500

Figure 6 : Détail du réseau de Hartig. x 18500

Figure 8 : Région du cortex profond. x 12900

Figure 10 : Détail du cylindre central. x 16200

PLANCHE XXXV



ETUDE ULTRASTRUCTURALE DES RACINES PORTEUSES DE MYCORHIZES DE *Fagus sylvatica* L.

Site de prélèvement : **site de Bezange, sol podzolique.**

Période de prélèvement : **printemps, automne, hiver 1996.**

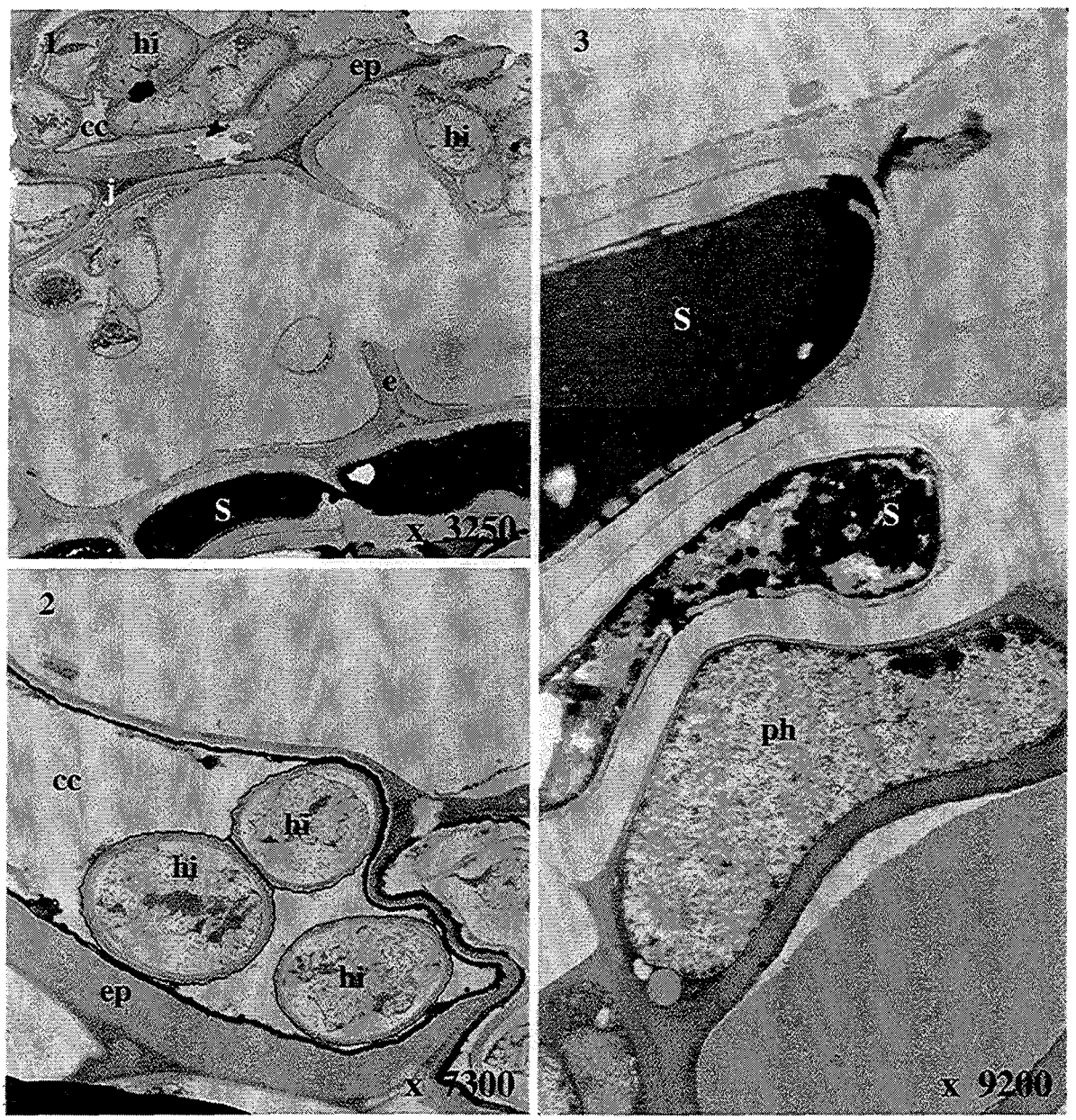
Pendant les trois périodes de prélèvements, les échantillons de racines porteuses de mycorhizes ont montré une organisation similaire.

Figure 1 : le cortex racinaire est envahi d'hyphes intracellulaires (hi) et se détache progressivement du cylindre central par rupture au niveau de l'endoderme (e). Les parois des cellules corticales présentent un épaississement (ep) important du côté interne de l'organe. S : suber. x 3250

Figure 2 : Détail des hyphes intracellulaires (hi). cc : cellule corticale ; ep : épaississement pariétal. x 7300

Figure 3 : Région du suber (S) mis en place dans le cylindre central des racines porteuses de mycorhizes. ph : phellogène. x 9200

PLANCHE XXXVI



ETUDE CYTOCHIMIQUE DES RACINES PORTEUSES DE MYCORHIZES DE *Fagus sylvatica* L.

Site de prélèvement : **site de Bezange, sol podzolique.**

Période de prélèvement : **printemps, automne, hiver 1996.**

Mise en évidence des polysaccharides par le test PATAg

Abréviations : hi : hyphe intracellulaire ; T : composés polyphénoliques ; cc : cellule corticale ; ep : épaississement pariétal ; e : endoderme ; S : suber ; p : parenchyme ; j : jonction cellulaire ; px : paroi des vaisseaux xylémiens ; a : amyloplastes.

Au printemps, le cortex renferme des hyphes intracellulaires dont la paroi est parfois réactive. En revanche, la paroi des cellules corticales l'est moins. Les parois des cellules de l'endoderme sont peu marquées, de même que les polyphénols qu'elles renferment. Dans le cylindre central, le marquage le plus intense est observé au niveau des jonctions cellulaires. Les parois des cellules du parenchyme montrent un faible marquage.

Figure 1 : Cortex d'une racine porteuse. x 13200

Figure 4 : Région de l'endoderme. x 13500

Figure 7 : Portion du cylindre central. x 12300

A l'automne, les parois des cellules du cortex, de l'endoderme et du suber sont peu ou pas réactives. Dans le cylindre central, les jonctions cellulaires et le liseré pariétal bordant la cavité des vaisseaux xylémiens sont marqués. Les parois des cellules du parenchyme et celles des vaisseaux le sont moins. De nombreux amyloplastes sont observés dans les cellules du parenchyme médullaire.

Figure 2 : Détail du cortex racinaire. x 3000

Figure 5 : Région de l'endoderme et du suber de la racine porteuse. x 2600

Figure 8 : Région du cylindre central de la racine porteuse. x 300

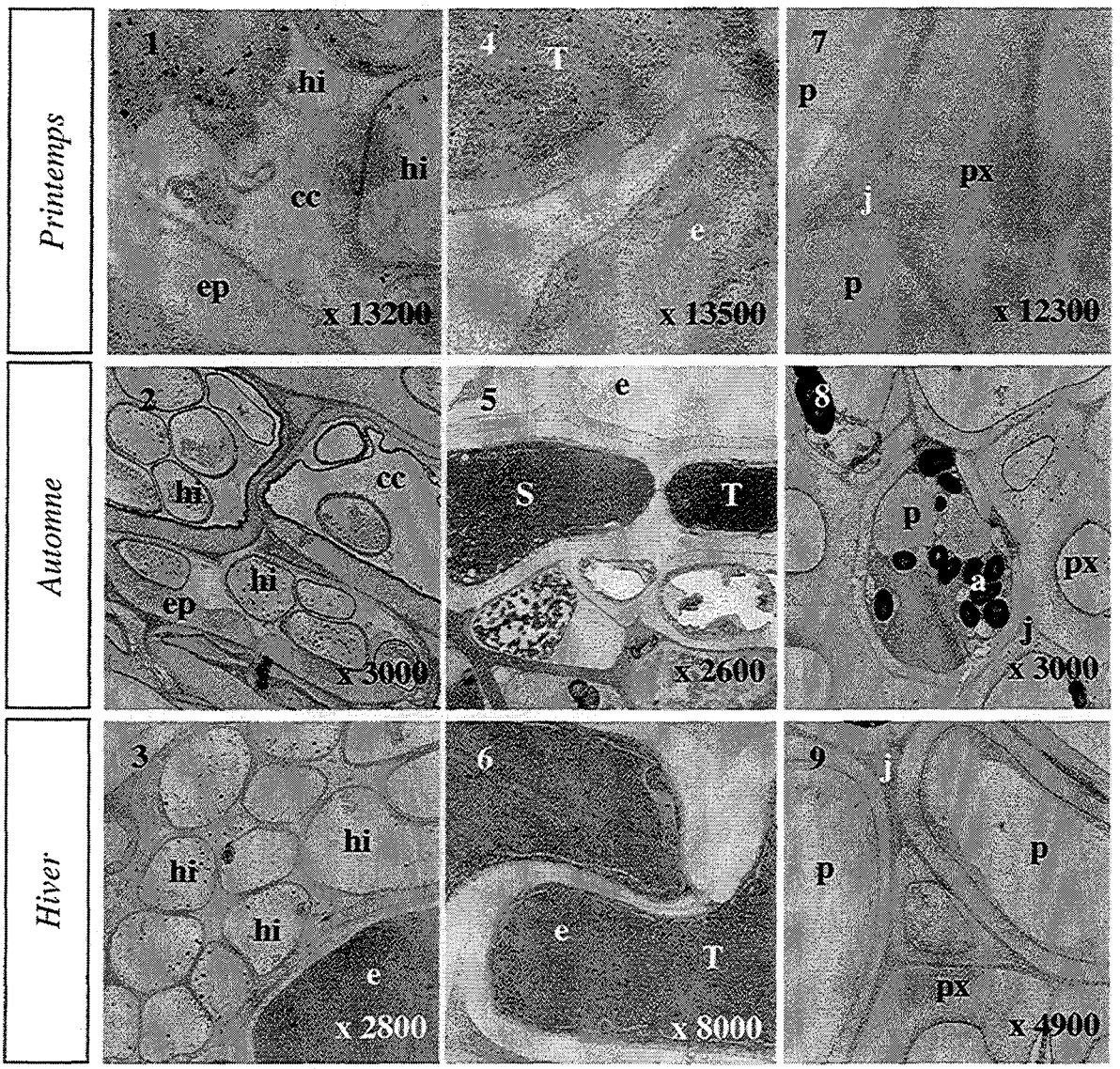
En hiver, un faible marquage est observé au niveau du cortex racinaire et de l'endoderme. Le cylindre central est peu réactif exception faite des jonctions cellulaires qui sont plus intensément marquées.

Figure 3 : Détail du cortex racinaire. x 2800

Figure 6 : Région de l'endoderme. x 8000

Figure 9 : Détail du cylindre central. x 4900

PLANCHE XXXVII



ETUDE CYTOCHIMIQUE DES RACINES PORTEUSES DE MYCORHIZES DE *Fagus sylvatica* L.

Site de prélèvement : **site de Bezange, sol podzolique.**

Période de prélèvement : **printemps, automne, hiver 1996.**

Mise en évidence des protéines riches en cystine par le réactif de Gomori-Swift

Abréviations : hi : hyphe intracellulaire ; T : composés polyphénoliques ; cc : cellule corticale ; ep : épaississement pariétal ; e : endoderme ; S : suber ; p : parenchyme ; j : jonction cellulaire ; px : paroi des vaisseaux xylémiens.

Au printemps, le cortex renferme des hyphes intracellulaires dont la paroi est parfois réactive. En revanche, la paroi des cellules corticales montre un marquage plus intense. Les parois des cellules de l'endoderme sont peu marquées alors que les polyphénols qu'elles renferment le sont plus. Dans le cylindre central, le marquage le plus intense est observé au niveau des jonctions cellulaires. Les parois des vaisseaux se subdivisent en trois zones : une zone externe peu marquée, une zone intermédiaire plus réactive et une zone interne qui n'est pas marquée. Les parois des cellules du parenchyme réagissent positivement.

Figure 1 : Cortex d'une racine porteuse. x 10200

Figure 4 : Région de l'endoderme. x 9000

Figure 7 : Portion du cylindre central. x 9600

A l'automne, les structures du cortex sont peu réactives. Au niveau de l'endoderme, la lamelle moyenne montre un léger marquage alors que les jonctions cellulaires ne réagissent pas au réactif de Swift. Dans le cylindre central, les jonctions cellulaires et le liseré pariétal bordant la cavité des vaisseaux xylémiens sont marqués. Les parois des cellules du parenchyme et celles des vaisseaux le sont moins.

Figure 2 : Cortex racinaire. x 12000

Figure 5 : Portion de l'endoderme de la racine porteuse. x 8800

Figure 8 : Région du cylindre central de la racine porteuse. x 9600

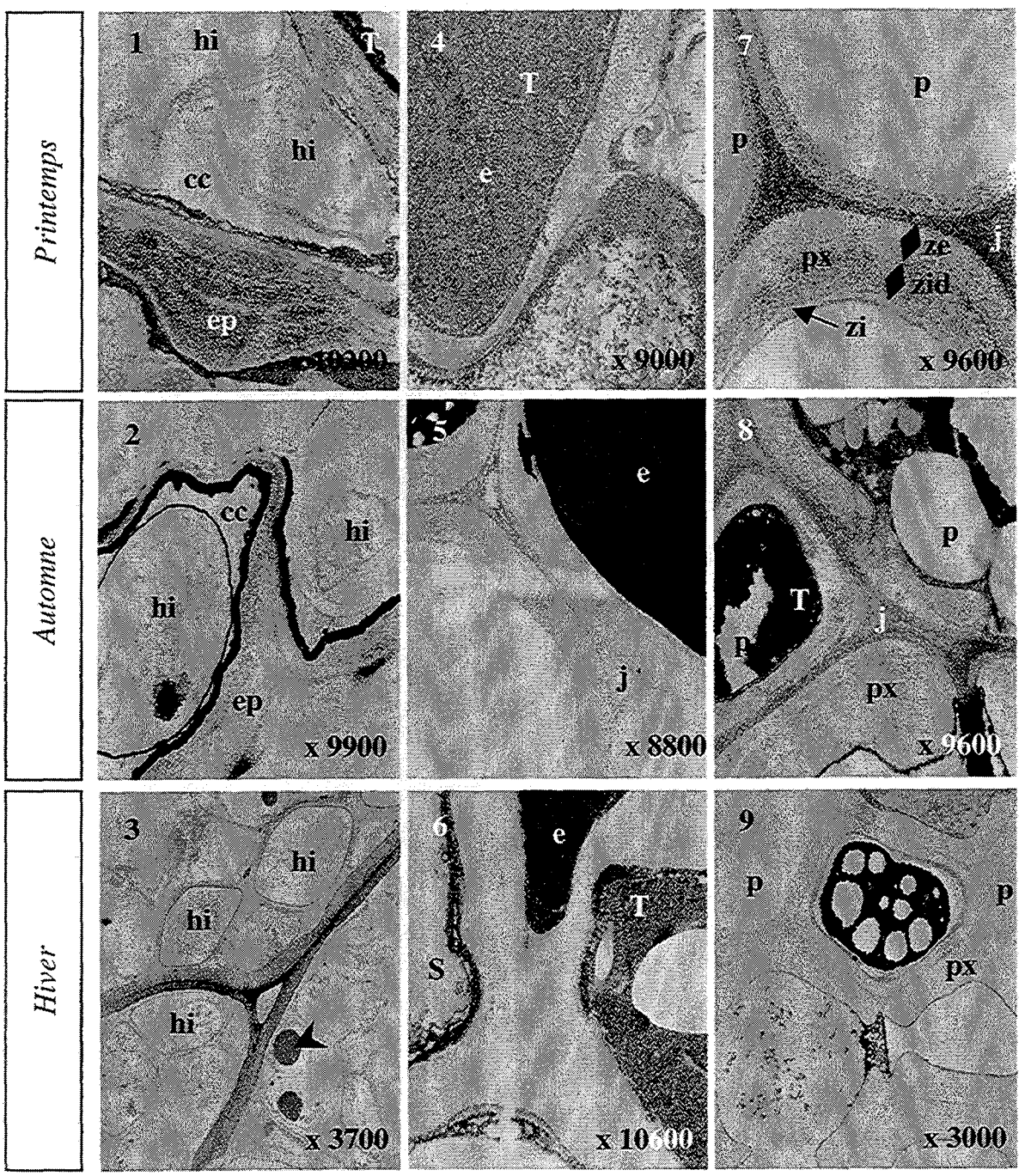
En hiver, les parois des cellules corticales sont marquées alors que celles des cellules de l'endoderme et du suber ne le sont pas. Les structures du cylindre central sont peu réactives.

Figure 3 : Détail du cortex racinaire. x 3700

Figure 6 : Région de l'endoderme et du suber. x 10600

Figure 9 : Détail du cylindre central. x 3000

PLANCHE XXXVIII



CONCLUSION GENERALE, PERSPECTIVES

L'objectif de ce travail était d'étudier quel est le rôle de deux champignons mycorhiziens dans la nutrition minérale du Hêtre en conditions naturelles.

Pour cela, les mycorhizes de *Cenococcum geophilum* et de *Lactarius subdulcis* ont été récoltées, pendant une année, dans deux sols très différents (un sol podzolique et une rendzine brunifiée) afin de mettre en évidence un effet du type de sol et des saisons sur les associations symbiotiques. D'autre part, afin d'appréhender la part des nutriments du sol absorbés par les champignons et transmis à l'arbre, les racines porteuses de mycorhizes ont été également prélevées en amont des mycorhizes sélectionnées.

Les études ont porté sur la morphologie, l'histologie, l'ultrastructure et sur les sites d'accumulation de certains éléments du sol (calcium, azote, silicium, phosphore, ...) au sein des structures mycorhiziennes et racinaires.

L'originalité de ces travaux repose en grande partie sur l'étude de mycorhizes naturelles, à l'aide de techniques, notamment microanalytiques, qui ont permis de mettre en évidence un comportement différent de deux champignons mycorhiziens selon le sol où ont été effectués les prélèvements. De même, l'évolution saisonnière de l'ultrastructure des organes mycorhiziens et de leur comportement vis-à-vis des éléments minéraux du sol en fonction des saisons a jusqu'à présent été très peu étudiée.

Nos travaux ont ainsi montré que le type de sol influe sur le niveau de développement des mycorhizes et qu'il pourrait également agir sur leur organisation.

En effet, l'aptitude à la colonisation d'un système racinaire par les champignons mycorhiziens est fortement tributaire des conditions du milieu. Ainsi, *Lactarius subdulcis* est rare dans le sol calcaire mais dominant dans le sol acide alors que *Cenococcum geophilum* présente les proportions inverses. Le pH serait le facteur principal expliquant cette répartition. En agissant sur le développement des champignons, il induirait une compétition interspécifique plus ou moins forte entre les différents organismes du sol, ce qui permettrait la dominance d'un type mycorhizien par rapport aux autres.

Nos travaux ont également révélé que l'organisation des mycorhizes de *Lactarius subdulcis* n'est pas modifiée par le type de sol, alors que *Cenococcum geophilum* peut être alternativement ectomycorhizien et ectendomycorhizien. Toutefois, pour ce champignon, nous n'avons pu mettre en évidence l'implication du phosphore ou de l'aluminium. Nous avons également émis l'hypothèse que le pH, en favorisant ou en limitant le développement de la microflore du sol, conditionnerait une compétitivité interspécifique plus ou moins forte qui pourrait induire des variations structurales des organes. Ainsi, *Cenococcum geophilum,* qui est un champignon peu compétitif, privilégierait sa fonction saprophytique lorsque la pression de

sélection est intense et sa fonction mycorhizienne lorsque la compétition entre les différents organismes du sol est moindre.

Concernant les nutriments du sol, un effet particulier du partenaire fongique vis-à-vis des ions n'a pu être clairement mis en évidence pour les deux champignons étudiés. Toutefois, les champignons mycorhiziens sont susceptibles de mobiliser de grandes quantités d'ions du sol. Cela a été notamment observé dans les mycorhizes de *Lactarius subdulcis*, qui sont capables d'accumuler, et donc d'absorber, des proportions importantes d'ions calcium, sur le sol podzolique qui est pauvre en éléments minéraux disponibles. De plus, les partenaires fongiques, en accumulant dans leurs structures, peuvent réguler le transport des éléments minéraux absorbés vers la racine. Ils jouent ainsi un rôle de filtre (*Lactarius subdulcis* sur rendzine brunifiée vis-à-vis du calcium) ou assurent une fonction de barrière plus ou moins importante grâce à certaines structures comme le mucilage (*Cenococcum geophilum* sur rendzine brunifiée vis-à-vis du calcium).

Parallèlement à l'effet du sol, une évolution saisonnière a pu être mise en évidence en ce qui concerne le glycogène fongique, l'azote, et dans une moindre mesure certains éléments minéraux. Ainsi, une mobilisation importante des réserves fongiques de même qu'une absorption intense d'éléments minéraux se produisent au printemps et pendant l'été pour subvenir aux besoins considérables de l'arbre pour sa croissance. La relative pauvreté des tissus racinaires formant les racines porteuses de mycorhizes tout au long de l'année n'a pas permis de mettre en évidence l'évolution saisonnière observée au niveau des mycorhizes. Les analyses effectuées au niveau de ces racines, essentiellement spécialisées dans la conduction des nutriments, ne rendent pas compte des flux d'éléments et correspondent à une situation ponctuelle. A l'automne, les éléments recherchés sont peu accumulés dans les structures fongiques et racinaires. Cela s'expliquerait soit par une consommation de nutriments pour la fructification des champignons (le lactaire), soit par une absorption réduite des éléments minéraux lorsque le champignon ne fructifie pas (*Cenococcum*) et a donc des besoins moindres. En automne et en hiver, les réserves de glycogène sont progressivement reconstituées.

Les travaux présentés dans ce mémoire constituent une première approche du rôle du partenaire fongique dans la nutrition des arbres en conditions naturelles et dégagent divers axes en vue de recherches futures.

- Dans un premier temps, il serait intéressant d'étudier avec plus de précision l'impact du pH du sol sur le développement des mycorhizes de Hêtre, en faisant un inventaire des différentes associations symbiotiques et en définissant leur pourcentage respectif dans les deux sols mais également dans d'autres sols présentant un pH intermédiaire.

- Un effet de filtre ou de barrière du champignon vis-à-vis des de certains éléments du sol a été abordé et il conviendrait par la suite d'étudier cet aspect en inoculant de jeunes plants de Hêtre avec les deux champignons séparément et en même temps, sur différents substrats. Ainsi, l'apport de doses massives, insuffisantes ou similaires à celles mesurées dans la nature permettrait d'observer le comportement des champignons face aux nutriments qui leur sont fournis. Ces expériences pourraient confirmer les modifications ultrastructurales que nous avons observé chez les mycorhizes de *Cenococcum geophilum* ainsi que l'implication d'éléments comme le phosphore ou l'aluminium dans ces variations.

- De plus, l'utilisation de plants non inoculés conduirait à la détermination de la sensibilité de l'arbre à différents facteurs et notamment aux ions calcium. En effet, le caractère calcicole, calcifuge ou indifférent du Hêtre ne semble pas avoir été précisé bien que certains chercheurs pensent que cet arbre serait plutôt acidiphile (Le Tacon, comm. Pers.).

- Le silicium n'a pas de rôle physiologique chez les arbres mais il semble néanmoins être absorbé sans difficulté. De plus, il présente une accumulation particulière dans les racines non infectées où il contribuerait fortement à la préservation de l'intégrité racinaire. Il serait donc intéressant d'étudier chez d'autres espèces ligneuses, les modalités du transport et de l'accumulation de cet élément minéral dans les structures biologiques afin de mieux comprendre ses fonctions. Une comparaison avec des plantes herbacées, accumulatrices ou non de silicium, apporterait de précieux renseignements.

- Nous avons pu observer une variation saisonnière des réserves fongiques notamment de l'azote. Des dosages biochimiques permettraient d'identifier entre autres les formes d'azote transférées des champignons vers la plante et inversement.

- Il conviendrait enfin d'étendre l'ensemble de ces expériences à d'autres mycorhizes formées soit par des champignons d'espèces différentes soit par des isolats d'une même espèce, ce qui permettrait de compléter l'aspect variabilité inter- et intraspécifique. L'outil moléculaire pourrait être d'une grande utilité pour l'identification des isolats.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Abuzinadah R.A., Read D.J. 1989. Carbon transfer associated with assimilation of organic nitrogen sources by silver birch (*Betula pendula* Roth.). *Trees.* **3**, 17-23.

Adriano D.C. 1986. Traces elements in the Terrestrial Environment. *Springer, New York, USA.* 533p.

Agerer R. 1990. Studies on ectomycorrhizae XXIV. Ectomycorrhizae of *Chroogomphus helveticus* and *C. rutilus* (Gomphidiaceae, Basidiomycètes) and their relationship to those of *Suillus* and *Rhizopogon. Nova Hedwigia.* **50**, 1-63.

Allen M.F., Moore T.S., Christensen M. 1980. Phytohormone changes in *Bouteloua gracilis* infected by vesicular-arbuscular mycorrhizae. I. Cytokinin increases in the host plant. *Can. J. Botany.* **58**, 371-374.

Allen M.F., Moore T.S., Christensen M. 1982. Phytohormone changes in *Bouteloua gracilis* infected by vesicular-arbuscular mycorrhizae. II. Altered levels of gibberellin-like substances and abscissic acid in the host plant. *Can. J. Bot.* **60**, 468-471.

Attiwill P.M., Adams M. 1993. Nutrient cycling in forest. *New Phytol.* **124**, 561-582.

Bakker M. 1998. Effet des amendements calciques sur les racines fines de chêne (*Quercus petraea* et *robur*) : conséquences des changements dans la rhizosphère. Thèse d'Université, Nancy I.

Barea J.M., Azcon-Aguilar C. 1982. Production of plant growth regulating sustances by the vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae. Appl. Environ. Microbiol.* **43**, 810-813.

Bartoli F. 1981. Le cycle biogéochimique du silicium sur roche acide. Application à deux écosystèmes forestiers tempérés (Vosges). Thèse d'Université, Nancy I.

Bawadikji A.H. 1993. Essais de mycorhization contrôlée entre quatre cèpes et quelques essences forestières : techniques culturales et aspects ultrastructuraux. Thèse d'Université, ENSA, Montpellier.

Beever R.E., Burns D.J.W. 1980. Phosphorus uptake, storage and utilization by fungi. *Adv. Bot. Res.* **8**, 127-219.

Béguiristain T. 1996. Isolement et caractérisation du composé indolique majeur de *Pisolithus tinctorius*, l'hypaphorine. Etude de son rôle au cours de l'établissement de l'ectomycorhize d'*Eucalyptus – Pisolithus.* Thèse d'Université, Nancy I.

Bending G.D., Read D.J. 1997. Lignin and soluble phenolic degradation by ectomycorrhizal and ericoid mycorrhizal fungi. *Mycol. Res.* **101**, 1348-1354.

Bennett D.M. 1982. Silicon deposition in the roots of *Hordeum sativum* Jess, *Avena sativa* L. and *Triticum aestivum* L. *Ann. Bot. London.* **50**, 239-245.

Bentivenga S.P., Hetrick B.A.D. 1992. Seasonal and temperature effects on mycorrhizal activity and dependence of cool- and warm-season tallgrass prairie grasses. *Can. J. Bot.* **70**, 1596-1602.

Berthelin J., Munier-Lamy C., Leyval C. 1995. Effect of microorganisms on mobility of heavy metals in soil. *In : Huang PM., Berthelin J., Bollarg JM., McGill WB., Page AL. (eds). Metals other inorganics and microbial activities. (Environmental impacts of soil component interactions), Lewis, Boca Raton, Fla.* **2**, 3-17.

Blaise T., Garbaye J. 1983. Effets de la fertilisation minérale sur les ectomycorhizes d'une hêtraie. *Acta Oecol., Oecol. Plant.* **4(18)**, 165-169.

Blasius D., Kottke I., Oberwinkler F. 1989. Spatial and seasonal dynamics of ectomycorrhizae of *Picea abies* (L.) Karst. in the Black Forest. *Agriculture, Ecosystems and Environment.* **28**, 27-30.

Bonneau M., Dambrine E., Nyc C., Ranger J. 1987. L'acidité des sols. *Bull. Ecol.* **18**, 127-136.

Botton B., El Badaoui K., Martin F. 1986. Induction of extracellular proteases in the ascomycete *Cenococcum geophilum. In : Physiological and Genetical aspects of Mycorrhizae, Proceedings of the 1st European Symposium on Mycorrhizae, Dijon, 1-5 July 1985, V. Gianinazzi-Pearson et S. Gianinazzi, ed, INRA, Paris.* 403-406.

Bougher NL., Malajczuk N. 1990. Effects of high soil moisture on formation of ectomycorrhizas and growth of karri (*Eucalyptus diversicolor*) seedlings inoculated with *Descolea maculata, Pisolithus tinctorius* and *Laccaria laccata. New Phytol.* **114**, 87-91.

Boullard B. 1990. Guerre et paix dans le règne végétal. *Ellipses, eds Markating, Paris.*

Bousquet U., Scheidecker D., Heller R. 1981. Effet des conditions de culture sur la nutrition calcique de plantules calcifuges ou calcicoles. *Physiologie végétale.* **43**, 287-316.

Boutekrabt A., Pargney J.C. 1991. Etude ultrastructurale de *Tuber melanosporum* Vitt. en culture isolée et en association avec des vitroplants de *Quercus* (*Q. robur* et *Q. pubescens*). *Cryptogamie, Mycologie.* **12**, 25-45.

Boutekrabt A., Chevalier G., Pargney J.C., Dexheimer J. 1990. Mycorhization par *Tuber melanosporum* Vitt. de vitroplants de *Quercus robur* L. et *Q. pubescens* Willd. *Agronomie.* **10**, 127-132.

Bowen G.D. 1970. Effects of soil temperatures on root growth and on phosphate uptake along *Pinus radiata* roots. *Aust. J. Soil Res.* **8**, 31-42.

Brand F. 1987. A secondary fungal infection in mycorrhizae formed by *Lactarius* spp with *Fagus sylvatica. In : Mycorrhizae in the next decade. Practical applications and research priorities (DM Sylvia, LL Hung, JH Graham, eds), Gainesville, FL, Etats Unis.* 189.

Brand F. 1993. Mixed associations of fungi in ectomycorrhizal roots. *In : Mycorrhizas in systems. CAB Int (DJ Read et al., eds), Sheffield, Royaume-Uni*, 142-147.

Brett C., Waldron K. 1990. Physiology and biochemistry of plant cell walls. *Eds. Black M. and Chapmann J., London.*

Brison M. 1978. Etude de l'humification par introduction *in situ* de maïs marqué (14C) comme traceur dans trois types d'humus sous hêtre. Thèse de Doctorat de 3° cycle, Université Nancy I.

Cairney J.W.G. 1992. Translocation of solutes in ectomycorrhizal and saprotrophic rhizomorphs. *Mycol. Res.* **96**, 135-141.

Cairney J.W.G., Burke R.M. 1994. Fungal enzymes degrading plant cell walls : their possible significance in the ectomycorrhizal symbiosis. *Mycol. Res.* **98**, 1345-1356

Callot G., Jaillard B. 1996. Incidence des caractéristiques structurales du sous-sol sur l'entrée en production de *Tuber melanosporum* et d'autres champignons mycorhiziens. *Agronomie.* **16**, 405-419.

Carisey N. 1990. Dynamique des éléments minéraux dans la sève xylémique d'un peuplement d'Epiceas dépérissant. Diplôme d'Etudes Approfondies. Université Nancy I.

Carnero Diaz I. 1992. Les spinules d'ectomycorhizes de truffes : étude morphologique et ultrastructurale. Diplôme d'Etudes Approfondies, Université Nancy I.

Carrodus B.B. 1966. Absorption of nitrogen by mycorrhizal roots of beech. I. Factors affecting the assimilation of nitrogen. *New Phytol.* **65**, 358-371.

Carrodus B.B. 1967. Absorption of nitrogen by mycorrhizal roots of beech. II. Ammonium and nitrate as sources of nitrogen. *New Phytol.* **66**, 1-4.

Chakravarty P., Unestam T. 1986. Role of mycorrhizal fungi in protectong damping- off of *Pinus* sylvestris L. seedlings. *In : Physiological and Genetical Aspects of Mycorrhizae, V. Gianinazzi-pearson and S. Gianinazzi, ed., proceedings of the 1st European Symposium of Mycorrhizae, Dijon. INRA, Paris.* 811-814.

Clément A.J., Garbaye J., Le Tacon F. 1977. Importance des ectomycorhizes dans la résistance au calcaire du Pin noir (*Pinus nigra* Arn. Ssp *nigricans* Host). *Oecol. Plant.* **12**, 111-132.

Colliex C., Jeanguillaume C., Mory C. 1984. Unconventional modes for STEM imaging of biological structures. *J. Ultrastructure Research.* **88**, 177-206.

Colpaert J.V., van Tichelen K.K. 1996. Decomposition, nitrogen and phosphorus mineralization from beech leaf litter colonized by ectomycorrhizal or litter-decomposing basidiomycetes. *New Phytol.* **134**, 123-132.

Danielson R.M., Visser S. 1989. Host response to inoculation and behaviour of introduced and indigenous ectomycorrhizal fungi of jack pine grown on soil-sands tailings. *Can. J. For. Res.* **19**, 1412-1421.

Deacon J.W., Donaldson S.J., Last F.T. 1983. Sequences and interactions of mycorrhizal fungi of birch. *Plant and Soil.* 71, 257-262.

Dennis R.W.G. 1968. British Ascomycetes. *J. Cramer, Lehre, Royaume-Uni.*

Dexheimer J., Pargney J.C. 1991a. Comparative anatomy of the host-fungus interface in mycorrhizae. *Experientia.* **47**, 312-321.

Dexheimer J., Pargney J.C. 1991b. Les interfaces des mycorhizes. Un exemple d'interactions pariétales. *Bull. Soc. Bot. Fr., Actual Bot.* **138 (3/4)**, 243-255.

Dickson R.E., Volgelmann T.C., Larson P.R. 1985. Glutamine transfer from xylem to phloem and translocation to developing leaves of *Populus deltoides. Plant Physiol.* 77, 412-417.

Dighton J. 1991. Acquisition of nutrients from organic ressources by mycorrhizal autotrophic plants. *Experientia.* **47**, 362-369.

Duchaufour P. 1970. Précis de Pédologie. Masson et C^{ie}, eds, Paris.

Duchesne L.C., Peterson R.L., Ellis B.E. 1987. The accumulation of plant-produced antimicrobial compounds in response to ectomycorrhizal fungi : a review. *Phytoprotection.* **68**, 17-27.

Duchesne L.C., Peterson R.L., Ellis B.E. 1988 a. Interaction between the ectomycorrhizal fungus *Paxillus involutus* and *Pinus resinosa* induces resistance to *Fusarium oxysporum. Can. J. Bot.* **66**, 558-562.

Duchesne L.C., Peterson R.L., Ellis B.E. 1988 b. Pine root exudate stimulates antibiotic synthesis by the ectomycorhizal fungus *Paxillus involutus. New Phytol.* **108**, 471-476.

Duddridge J.A., Malibari A., Read D.J. 1980. Structure and function of mycorrhizal rhizomorphs with special reference to their rôle in water transport. *Nature.* **287**, 834-836.

El Fares A. 1974. Contribution à l'étude des mycorhizes de l'épicea. Méthodes expérimentales et influence des sols et des litières. Thèse d'Université, Nancy I.

Evans D.E., Briars S.A., Williams L.E. 1991. Active calcium transport by cell membranes. *J. Experimental Botany.* **42(236)**, 285-303.

Ferdinandsen C., Winge Ö. 1925. *Cenococcum* Fr. A monographic study. Kgl. Veterinaer Landbohjsk. Aarsskr. 332-382.

Finlay R.D., Frostegard A., Sonnerfeldt A-M. 1992. Utilization of organic and inorganic nitrogen sources by ectomycorrhizal fungi in pure culture and in symbiosis with *Pinus contorta* Dougl. Ex Loud. *New Phytol.* **120**, 105-115.

Fortas Z., Chevalier G. 1988. Effet des conditions de culture sur la mycorhization d'*Helianthemum guttatum* par trois espèces des genres *Terfezia* et *Tirmania* (truffes du désert). *2° Congresso Internazionale sul Tartufo, Spoleto.* 197-204.

France R.C. 1980. Nitrogen relations of pine ectomycorrhizae. *Philos. Doct. Diss., Colorado State, Fort Collins, CO.*

France R.C., Reid C.P.P. 1979. Absorption of ammonium and nitrate by mycorrhizal and non mycorrhizal roots of pine. *In : Root Physiology ans Symbiosis, proceedings of the I.U.F.R.O. Symposium S2-01-13, Nancy, 11-15 Septembre 1978, A. Riedacker et J. Gagnaire-Michard, ed, INRA, Nancy.* 336-345.

Francis R., Read D.J. 1994. The contributions of mycorrhizal fungi to the determination of plant community structure. *In : Management of Mycorrhizas in Agriculture, Horticulture and Forestry, eds. Robson A.D., Abott L.K. and Malajczuk N., Kluwer Academis Publishers.* 11-26.

Franck A.B. 1885. Uber die auf Wurzelsymbiose beruhende Ernährung gewisser Baüme durch unterirdische Pilze. *Ber. Dtsch. Bot. Ges.* **3**, 128-145.

Gadgil R.L., Gadgil P.D. 1971. Mycorrhiza and litter decomposition. *Nature.* **233**, 133.

Garciduenas Pina R., Cervantes C. 1996. Microbial interactions with aluminium. *Biometals.* **9**, 311-316.

Gay G., Garrec J.P. 1980. Premiers essais de microlocalisation de quelques éléments minéraux dans les racines courtes et les mycorhizes de *Pinus halepensis* Mill. *C. R. Acad. Sci., Paris.* **290**, 69-71.

Gea L. 1995. Contribution à la connaissance des interfaces de surface dans les ectomycorhizes : approche par cytologie d'affinité et analyse ionique. Etude d'un modèle hypermycorhizien : *Pinus pinaster / Hebeloma cylindrosporum.* Thèse d'Université, Paris VI.

Genet P. 1994. Cytolocalisation du calcium dans les ectomycorhizes de truffe : approche par différentes techniques de microscopie. Diplôme d'Etudes Approfondies, Université Nancy I.

Genet P., Pargney J.C. 1994. Calcium localization in walls of *Tuber melanosporum* associated with *Corylus avellana* : advantages and limits of different techniques. *J. Trace and Microprobe Techniques.* **12**, 331-342.

Genetet I., Martin F., Stewart G. 1984. Nitrogen assimilation in mycorrhiza. Ammonium assimilation in the N-starved ectomycorrhizal ascomycete *Cenococcum geophilum. Plant Physiol.* **76**, 395-399.

Gianinazzi-Pearson V., Diem H.G. 1982. *In : Microbiology of tropical soils. Implications in soil management, eds Y.R. Dommergues, H.G. Diem, Martinus Nijhoff, Le Havre.* 209-251.

Gilmour J.T. 1984. The effects of soil properties on nitrification and nitrification inhibition. *Soil Science Soc. America J.* **48**, 1262-1266.

Gomori G. 1946. The study of enzymes in tissue sections. *Ann. J. Clin. Path.* **16**, 347-359.

Griffiths R.P., Caldwell B., Cromack K., Morita R.Y. 1990. Douglas-fir forest soils colonized by ectomycorrhizal mats. I. Seasonal variation in nitrogen chemistry and nitrogen cycle transformation rates. *Can. J. For. Res.* **20**, 211-218.

Gulyas F., Füleky G. 1994. Data on the C- and N-transformation dynamics of the soil. *Acta Biologica Hungarica.* **45(1)**, 51-58.

Hammel K.E. 1997. Fungal degradation of lignin. *In : Driven by nature plant litter quality and decomposition. G. Cadish, K.E. Giller, ed. CAB International.* 33-42.

Harborne J.B. 1980. Plant phenolics. *In : Encyclopedia of Plant Physiology, N.S., vol. 8 : Secondary plant products, Bell E.A., Charlwood B.V., eds, Springer, Berlin Heidelberg, New York.* **8**, 329-402.

Harborne J.B. 1982. Introduction of ecological biochesmistry. *Academic Press, London.*

Harley J.L. 1958. The Biology of Mycorrhiza. *1st edition, Leonard Hill, London.*

Harley J.L. 1964. Incorporation of carbon dioxide into excised beech mycorrhizas in the presence and absence of ammonia. *New Phytol.* **63**, 203-208.

Harley J.L., Mc Cready C.C. 1981. Phosphate accumulation in *Fagus* mycorrhizas. *New Phytol.* **89**, 75-80.

Harley J.L., Smith S.E. 1983. « Mycorrhizal Symbiosis ». *Academic Press, New York.*

Harvey A.E., Jurgensen M.F., Larsen M.J. 1978. Seasonal distribution of ectomycorrhizae in a mature Douglas-fir / Larch forest soil in western Montana. *For. Sci.* **24(2)**, 203-208.

Hasnaoui B., Bonin G., Garzino S. 1996. *Quercus canarienses* Willd : variations saisonnières et stationnelles des teneurs en éléments minéraux des feuilles en Kroumirie (Tunisie). *Ann. Sci. For.* **53**, 899-913.

Heller R., Esnault R., Lance C. 1989. *In : Physiologie Végétale. Tome 1 : Nutrition, eds Masson.*

Hilton R.N., Malajczuk N., Pearce M.H. 1989. Larger fungi of Jarrah forest : an ecological and taxonomic survey. *In : Dell B., Havel J.J. and Malajczuk N., eds, The Jarrah forest. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht. 89-109.*

Hoffman G. 1972. Wachstumrhythmik der Wurgel und Sprossachsen von Forstgehölzen. *Flora Bd.* **161**, 303-319.

Hung L., Trappe JM. 1983. Growth variation between and within species of ectomycorrhizal fungi in response to pH in vitro. *Mycologia.* **75**, 234-241.

Hutton J.T., Norrish K. 1974. Silicon content of wheat husks in relation to water transpired. *Austr. J. Agricul. Res.* **25**, 203-212.

Iassac S. 1992. Fungal-Plant Interactions. *Eds Chapman et Hall, London.* 418p.

Jauneau A., Morvan C., Lefevre F., Demarty M., Ripoll C., Thellier M. 1992. Differential extractability of calcium and pectic substances in different wall regions of epicotyl cells in young flax plants. *J. Histochem. Cytochem.* **40**, 1183-1189.

Jussy J-H. 1998. Minéralisation de l'azote, nitrification et prélèvements radiculaires dans différents écosystèmes forestiers sur sol acide. Effets de l'essence, du stade de développement du peuplement et de l'usage ancien des sols. Thèse d'Université, Nancy I.

Juste C. 1988. Appréciation de la mobilité et de la disponibilité des éléments en traces du sol. *Science du sol.* **26**, 103-112.

Kieliszewska-Rokicka B., Rudawska M., Leski T., Kurczynska EU. 1998. Effect of low pH and aluminium on growth of *Pinus sylvestris* L. seedlings mycorrhizal with *Suillus luteus* (L. ex. Fr.) S.F. Gray. *Chemosphere.* **36**, 751-756.

Kinraide T.B. 1993. Aluminum enhancement of plant growth in acid rooting media. A case of reciprocal alleviation of toxicity by two toxic cations. *Physiologie Plantarum.* **88**, 619-625.

Klironomos J.N., Kendrick B. 1995. Relationships among microarthropods, fungi, and their environment. *Plant and Soil.* **170**, 183-197.

Kolattukydy P.E. 1984. Biochemistry and function of cutin and suberin. *Can. J. Bot.* **62**, 2918-2933.

Kope H.H., Fortin J.A. 1989. Inhibition of phytopathogenic fungi in vitro by cell culture media of ectomycorrhizal fungi. *New Phytol.* **113**, 57-63.

Kottke I., Holopainen T., Alanen E., Turnau K. 1995. Deposition of nitrogen in vacuolar bodies of *Cenococcum geophilum* Fr. mycorrhizas as detected by electron energy loss spectroscopy. *New Phytol.* **129**, 411-416.

Kottke I., Pargney J.C., Qian X.M., Le Disquet I. 1994. Passage and deposition of solutes in the hyphal sheath of ectomycorrhiza : the soil-root interface. *In : Eurosilva Contribution to Forest Tree Physiology. INRA eds.* 255-271.

Kottke I., Oberwinkler F. 1986. Mycorrhiza of forest trees. Structure and function. *Trees.* **1**, 1-24.

Kusano S. 1911. *Gastrodia elata* and its symbiotic association with *Armillaria mellea. J. Agr., Tokyo.* **4**,1-66.

Lange B.M., Lapierre C., Sandermann H. 1995. Elicitor-induced spruce stress lignin. Structural similarity to early developmental lignins. *Plant Physiol.* **108**, 1277-1287.

Lapeyrie F. 1983. Recherches préliminaires sur le rôle des ectomycorhizes dans l'implantation d'*Eucalyptus delegatensis* en France. Thèse d'Université, Lyon I.

Lapeyrie F., Bruchet G. 1982. Protection d'*Eucalyptus delegatensis* vis-à-vis du calcaire par des champignons ectomycorhiziens. *Annales AFOCEL.* 213-231.

Lapeyrie F., Bruchet G. 1986. Calcium accumulation by two strains calcicole and calcifuge, of the mycorrhizal fungus *Paxillus involutus. New Phytol.* **103**, 133-141.

Lapeyrie F., Chilvers G.A., Behm C.A. 1987. Oxalic synthesis by the mycorrhizal fungus *Paxillus involutus. New Phytol.* **106**, 139-146.

Le Disquet I. 1997. Etude du rôle du partenaire fongique dans l'absorption, le transport et le stockage des cations chez les ectomycorhizes. Thèse d'Université, Nancy I.

Le Tacon F. 1976. La présence de calcaire dans le sol. Influence sur le comportement de l'épicea commun (*Picea excelsa* Link.) et du pin noir d'Autriche (*Pinus nigra nigricans* Host.). Thèse, INPL, Nancy.

Le Tacon F., Toutain F. 1973. Variations saisonnières et stationnelles de la teneur en éléments minéraux des feuilles de hêtre (*Fagus sylvatica)* dans l'est de la France. *Ann. Sci. Forest.* **30**, 1-29.

Lehto T. 1994. Effects of soil pH and calcium on mycorrhizas of *Picea abies. Plant and Soil.* **163**, 69-75.

Lei J. 1988. Etude expérimentale des systèmes mycorhiziens de quelques essences ligneuses. Application pratique à la mycorhization de vitroplants. Thèse d'Université, Nancy I.

Leyval C., Berthelin J. 1989. Interactions between *Laccaria laccata, Agrobacterium radiobacter* and beech roots : influence on P, K, Mg, and Fe mobilization from minerals and plant growth. *Plant and Soil.* **117**, 103-110.

Ling-Lee M., Chilvers G.A., Ashford A.E. 1977. A histochemical study of phenolic materials in mycorrhizal and uninfected roots of *Eucalyptus fastigata* Daine and Maiden. *New Phytol.* **78**, 313-328.

Lunt P.H., Hedger J.N., Savidge J.P. 1994. Natural recolonisation of reinstated opencast coal mine site by the ectomycorhizal fungi of *Quercus petraea. Fourth European Symposium on Mycorrizas. Granada, 11-14 Jully 1994.*

Malajczuk N., Cromack K. (Jr.). 1982. Accumulation of calcium oxalate in the mantle of ectomycorrhizal roots of *Pinus radiata* and *Eucalyptus marginata. New Phytol.* **92**, 527-531.

Malajczuk N., Molina R., 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.

Mangabeira P., Mushrifah I., Escaig F., Laffray D, Galle P. 1997. Distribution and localization of aluminium in *Vicia faba* using SIMS microscopy. *Plant sciences, 3è Colloque SFPV, Toulouse, France, 1-3 décembre 1997.* 347-348.

Marschner H. 1986. General introduction to the mineral nutrition of plants. *In : U. Luttge and A.M.G. Pitman eds. Encyclopedia of Plant Physiology.* **15 part A**, 5-59.

Marschner H, Haussling M., George E. 1991. Ammonium and nitrate uptake rates and rhizosphere-pH in non-mycorrhizal roots of Norway spruce (*Picea abies* (L.) Karst.). *Trees.* **5**, 14-21.

Marschner H, Romheld V., Ossenberg-Neuhans H. 1982. Rapid method for measuring changes in pH and reducing processes along roots of intact plants. *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie.* **105**, 407-416.

Martin F., Botton B. 1993. Nitrogen metabolism of ectomycorrhizal fungi and ectomycorrhiza. *Adv. Plant Path.* **47**, 83-102.

Martin F., Hilbert J.L. 1991. Morphological, biochemical and molecular changes during ectomycorrhiza development. *Experientia.* **47**, 321-331.

Martin F., Stewart G., Genetet I., Le Tacon F. 1986. Assimilation of $^{15}NH_4^+$ by beech (*Fagus sylvatica* L.) ectomycorrhizas. *New Phytol.* **102**, 85-94.

Mason P.A., Last F.T., Pelham J., Ingleby K. 1982. Ecology of some fungi associated with an ageing stand of birches (*Betula pendula* and *B. pubescens*). *Forest Ecology Management.* **4**, 19-39.

Massicotte H.B., Peterson R.L., Ackerley C.A., Melville L.H. 1990. Structure and ontogeny of *Betula allenghaniensis – Pisolithus tinctorius* ectomycorrhizae. *Can. J. Bot.* **68**, 579-583.

Medeiros CAB., Clark RB., Ellis JR. 1994. Growth and nutrient uptake of *Sorghum* cultivated with vesicular-arbuscular mycorrhiza isolates at varying pH. *Mycorrhiza.* **4**, 185-191.

Mercé J. 1987. Hyphomycètes aquatiques. Etudes des variations saisonnières d'une population. *Cryptogamie, Mycol.* **(8)1**, 1-11.

Metzler B., Oberwinkler F. 1987. The in-vitro-mycorrhization of *Pinus sylvestris* L. and its dependence on the pH-value. *Eur. J. For. Path.* **17**, 385-397.

Mikola P. 1948. On the physiology and ecology of *Cenococcum graniforme*, especially as a mycorrhizal fungus of birch. *Comm. Inst. For. Fenn.* **36**, 7-101.

Mikola P. 1973. Application of mycorrhizal symbiosis in forestry practice. *In : Ectomycorrhizae. Their Ecology and Physiology, GC Marks and TT Kozlowski éd, Academic Press, New York, London.* 383-411.

Monties B. 1989. Lignins. *In : Dey PM, Harborne JB (eds), Methods in plant biochemistry, Academic Press, London.* **1**, 113-157.

Moreau F. 1960. Botanique. *Encyclopédie de la Pléiade, NRF Gallimard ed., Paris.* 1531p.

Morris E.R., Powell D.A., Gildey M.J., Rees D.A. 1992. Conformations and interactions of pectins. *J. Mol. Biol.* **155**, 507-516.

Mousain D. 1989. Etude de la nutrition phosphatée de symbiotes ectomycorhiziens. Thèse de Doctorat d'Etat, Université des Sciences et Techniques du Languedoc, Montpellier.

Moyersoen B., Fitter AH., Alexander IJ. 1998. Spatial distribution of ectomycorrhizas and arbuscular mycorrhizas in Korup National Park rain forest, Cameroon, in relation to edaphic parameters. *New Phytol.* **139**, 311-320.

Näsholm T., Ericsson A. 1990. Seasonal changes in amino acids, proteins and total nitrogen in needles of fertilized Scots pine trees. *Tree Physiology.* **6**, 267-281.

Nye P.H. 1981. PH changes across the rhizosphere induced by roots. *Plant and Soil.* **61**, 7-26.

Okuda A., Takahashi E. 1965. The rôle of silicon. *Min. Nutr. Rice Plant, Proc. Symp. Int. Rice Res. Inst.* 123-146.

Orlovich D.A., Ashford A.E. 1993. Polyphosphates granules are an artefact of specimen preparation in the ectomycorrhizal fungus *Pisolithus tinctorius. Protoplasma.* **173**, 91-102.

Ortas I., Harris P.J., Rowell D.L. 1994. The effect of form and rate of N application on liberation of H^+ and OH^- /HCO_3^- and pH change at root-soil interface in mycorrhizal and non-mycorrhizal sorghum plants. *Fourth European Symposium on Mycorrhizas. 11-14 July 1994, Granada.*

Pais M.S., Barroso J. 1983. Localization of polyphenoloxidases during the establishment of *Ophrys lutea* endomycorrhizas. *New Phytol.* **95**, 219-222.

Pargney J.C. 1990. Essais de caractérisation cytochimique des structures de l'interface au niveau du réseau de Hartig dans l'association ectomycorhizienne entre la truffe (*Tuber melanosporum*) et le noisetier (*Corylus avellana*). *Can. J. Bot.* **68**, 2722-2728.

Pargney J.C. 1991. Cytochimie ultrastructurale des interfaces présentes dans l'association ectomycorhizienne *Tuber melanosporum* Vitt. / *Corylus avellana* L. *Cryptogamie, Mycol.* **12**, 47-61.

Pargney J.C. 1994. Connaissances actuelles su la structure, la biologie et l'écologie de la truffe. *Bull. Aca. Soc. Lorr. Sci.* **33**, 159-173.

Pargney J.C., Leduc J.P. 1990. Etude ultrastructurale de l'association mycorhizienne Noisetier/Truffe (*Corylus avellana/Tuber melanosporum). Bull. Soc. Bot. Fr., Lett. bot.* **137**, 21-34.

Pargney J.C., Brimont A. 1995. Production of concentrated polyphenols by the root cap cells of *Corylus* associated with *Tuber* : ultrastructural study and element localization using electron energy loss spectroscopy and imaging. *Trees.* **9**, 149-157.

Pargney J.C., Genet P. 1994. Etude cytologique du transfert du calcium dans les ectomycorhizes. *Bull. Soc. Ecophysiologie.* **XIX- 1-2**, 43-54.

Pargney J.C., Kottke I. 1994. Microlocalization of calcium in the walls of truffle mycorrhizae by analytical transmission electron microscopy. *J. Trace and Microprobe Techniques.* **12 (4)**, 305-312.

Pargney J.C., Prévost A. 1996. Comparaison des ectomycorhizes naturelles entre le hêtre (*Fagus sylvatica*) et 2 lactaires (*Lactarius blennius* var *viridis* et *Lactarius subdulcis*). II. Caractéristiques cytochimiques des interfaces. *Ann. Sci. For.* **53**, 991-1003.

Paris F., Dexheimer J., Lapeyrie F. 1993. Cytochemical evidence of a fungal cell wall alteration during infection of *Eucalyptus* roots by the ectomycorrhizal fungus *Cenococcum geophilum. Archives of Microbiology.* **159**, 526-529.

Parke J.L., Linderman R.G., Trappe J.M. 1983. Effect of root zone temperature on ectomycorrhiza and vesicular-arbuscular mycorrhiza formation in disturbed and undisturbed forest soil of southwest Oregon. *Can. J. For. Res.* **13**, 657-665.

Passama L., Ghorbal M.H., Hamze M., Salsac L., Wacquant J.P. 1975. Sur quelques facteurs écophysiologiques de différenciation entre calcicoles et calcifuges en milieu calcaire. *Revue d'Ecologie et de Biologie du sol.* **12**, 309-327.

Piché Y., Fortin J.A., Lafontaine J.G. 1981. Cytoplasmic phenols and polysaccharides in ectomycorrhizal and non-mycorrhizal short roots of pine. *New Phytol.* **88**, 695-703.

Piché Y., Peterson R.L., Massicotte H.B. 1988. Host-fungus interactions in ectomycorrhizae. *In : Cell to Cell signals in Plant, Animal and Microbial Symbiosis, ed. S. Scannerini, D.C. Smith, P. Bonfante-Fasolo, V. Gianinazzi-Paerson, Springer Verlag, Berlin, Germany.* 219-235.

Pottier L. 1986. Etude expérimentale des interactions minéraux-hyphes mycéliens. Cas d'un système carbonaté siliceux. Thèse d'Université, ENSA, Montpellier.

Prévost A. 1992. Contribution à l'étude cytophysiologique de la symbiose ectomycorhizienne chez les végétaux ligneux (Gymnospermes et Angiospermes). Thèse d'Université, Nancy I.

Prévost A., Pargney J.C. 1995. Comparaison des ectomycorhizes naturelles entre le hêtre (*Fagus sylvatica*) et 2 lactaires (*Lactarius blennius* var. *viridis* et *Lactarius subdulcis*). I. Caractéristiques morphologiques et cytologiques. *Ann. Sci. For.* **52**, 131-146.

Prévost A., Pargney J.C. 1997. Comparaison des ectomycorhizes naturelles entre le hêtre (*Fagus sylvatica*) et 2 lactaires (*Lactarius blennius* var. *viridis* et *Lactarius subdulcis*). III. Les rhizomorphes. *Ann. Sci. For.* **54**, 117-124.

Rastin N., Schlechte G., Hüttermann A., Rosenplänter K. 1990. Seasonal fluctuation of some biological and biochemical soil factors and their dependence on certain soil factors on the upper and lower slope of a spruce forest. *Soil Biol. Biochem.* **22(8)**, 1049-1061.

Raven H., Evert F., Eichhorn E. 1992. Biology of plants. The Angiosperm plant body : structure and development. *Fith edition, Worth Publishers, New York.*

Read D.J. 1991. Mycorrhizas in ecosystems. *Experientia.* **47**, 376-390.

Read D.J., Lewis D.H., Fitter A.H., Alexander I.J. 1992. Mycorrhizas in ecosystems. *C.A.B. International, Wallingford, UK.* 419p.

Rees D.A. 1977. Polysaccharide shape. Outline studies in biology. *Eds Chapmann et Hall, London.*

Reid C.P.P. 1979. Mycorrhizas and water stress. *In : Root Physiology and Symbiosis, proceedings of the I.U.F.R.O. Symposium S2-01-13, Nancy, 11-15 Septembre 1978, A. Riedacker et J. Gragnaire-Michard, ed, INRA, Nancy.* 392-408.

Reimer L. 1995. Energy-Filtering Transmission Electron Microscopy. *Springer Series Optical Sciences, ed. 1995, vol. 71. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.*

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.

Riedacker A. 1981. Croissance aérienne et souterraine. *In : Le Hêtre (E. Teissier Du Cros, eds INRA).* 160-169.

Robert D., Laroche J., Guervin C., Lecoq C., Sauvanet A. 1973. Mise en place de la silice dans les cellules épidermiques d'une la feuille d'une Ptéridophyte : *Selaginella kraussiana.* II. Etude ultrastructurale. *Bull. Mus. Hist. Nat.* **201**, 210-233.

Robson A.D., Abbott L.K. 1989. The effect of soil acidity on microbial activity in soils. Soil Acidity and Plant Growth. 139-165.

Roland J.C. 1980. Ultrastructure et texture des polysaccharides dans la paroi des cellules végétales. Les polymères végétaux. Polymères pariétaux et alimentaires non azotés. *Biochimie appliquée.* 46-65.

Roland J.C., Vian B. 1991. General preparation and staining of thin sections. *In : Electron Microscopy of Plant Cells. Eds Hall J.L. and Hawes C. Academic press.*

Rose S.L., Paranka J.E. 1987. The location of roots and mycorrhizae in tropical forest soil. *In : Sylvia DM, Hung LL, GrahamJH, eds Mycorrhizae in the Next Decade. Gainesville, FL, USA : University of Florida,* 165.

Rudawska M., Kieliszewska-Rokicka B., Leski T. 1996. Effect of acid rain and aluminium on the mycorrhizas of *Pinus sylvestris. In : Mycorrhizae in Integrated Systems from Genes to Plant Development (C Azcon-Aguilar, J Barea, eds), Brussels, Belgium.* 469-471.

Ryan P.R., Kinraide T.B., Kochian L.V. 1994. Al^{3+} - Ca^{2+} interactions in aluminium rhizotoxicity. *Planta.* **192**, 98-103.

Samson J., Fortin J.A. 1986. Ectomycorrhizal fungi of *Larix laricina* and the interspecific and intraspecific variation in response to temperature. *Can. J. Bot.* **64**, 3020-3028.

Sayed W.F., Wheeler C.T., Zahran H.H., Shoreit A.A.M. 1997. Effect of temperature and soil moisture on the survival and symbiotic effectiveness of *Frankia* spp. *Biology and Fertility of Soils.* **25**, 349-353.

Sayer J.A., Kierans M., Gad G.M. 1997. Solubilisation of some naturally occuring metal-bearing minerals, limescale and lead phosphate by *Aspergillus niger. FEMS Microbiol. Letters.* **154**, 29-35.

Schachtman D.P., Reid R.J., Ayling S.M. 1998. Phosphorus uptake by plants : from soil to cell. *Plant Physiol.* **116**, 447-453.

Schaedle M., Thornton F.C., Raynal D.J., Tepper H.B. 1989. Response of tree seedlings to aluminium. *Tree Physiologie.* **5**, 337-356.

Shafer S.R., Grand L.F., Bruck R.I, Heagle A.S. 1985. Formation of ectomycorrhizae on *Pinus taeda* seedlings exposed to simulated acid rain. *Can. J. For. Res.* **15**, 66-77.

Slankis V. 1974. Soil factors influencing formation of mycorrhizae. *Ministry of Natural Ressources, Forest Research Branch, Maple, Ontario, Canada.* 437-457.

Smith F.A. 1972. A comparison of the uptake of nitrate, chloride and phosphate by excised beech mycorrhizas. *New Phytol.* **71**, 875-882.

Smith S.E., Read D.J. 1997. Mycorrhizal Symbiosis. *2nd édition, Academic Press.*

Sougnez-Rémy S., Waterkeyn L., Van Praag H.J. 1993. L'absorption-translocation spécifique d'éléments nutritifs en relation avec la structure anatomique des radicelles de Hêtre (*Fagus sylvatica*) et d'Epicea (*Picea abies*). II. Observations relatives à la structure anatomique des radicelles. *Belg. J. Bot.* **126 (2)**, 184-190.

Sreng M. 1977. Etude écologique des champignons filamenteux des litières de hêtre en milieu calcaire et acide dans l'est de la France. Thèse d'Université, Nancy I.

Staaf H. 1988. Litter decomposition in beech forest effects of excluding tree roots. *Biology and Fertility of Soils.* **6**, 302-305.

Sterner O., Bergman R., Kihlberg J., Wickberg B. 1985. The sesquiterpens of *Lactarius vellereus* and their role in a proposed chemical defense system. *J. Nat. Prod.* **48**, 279-288.

Stroo H.F., Reich P.B., Schoettle A.W., Amundson R.G. 1988. Effects of ozone and acid rain on white pine (*Pinus strobus*) seedlings grownin five soils. II. Mycorrhizal infection. *Can. J. Bot.* **66**, 1510-1516.

Strullu D.G. 1988. Mycorhizes et nutrition minérale des plantes : un modèle unifié de fonctionnement. *C.R. Acad. Agric. Fr.* **74**, 37-44.

Strullu D.G. 1991. Les relations entre les plantes et les champignons. *In : Les mycorhizes des arbres et des plantes cultivées. Eds D.G. Strullu, Tech. Doc. Lavoisier, 250, Paris.* 7-49.

Strullu D.G., Harley J.L., Gourret J.P., Garrec J.P. 1982. Ultra-structure and microanalysis of the polyphosphate granules of the ectomycorrhizas of *Fagus sylvatica. New Phytol.* **92**, 417-423.

Strullu D.G., Harley J.L., Gourret J.P., Garrec J.P. 1983. A note on the relative phosphorus and calcium contents of metachromatic granules in *Fagus* mycorrhiza. *New Phytol.* **94**, 89-94.

Strullu D.G., Grellier B., Garrec J.P., McCready C.C., Harley J.L. 1986. Effects of monovalent and divalent cations on phosphate absorption by beech mycorrhizas. *New Phytol.* **103**, 403-416.

Stotzky G. 1967. Clay minerals and microbial ecology. *Trans. N. York Acad. Sci.* **30**, 11-21.

Swift J.A. 1968. The electron histochemistry of the cystine-containing proteins in thin transverse section of human hair. *J. R. Micr. Soc.* **88**, 449-460.

Sylvia D.M., Sinclair W.A. 1983. Phenolic compounds and resistance to fungal pathogens induced in primary roots of Douglas-fir seedlings by the ectomycorrhizla fungus *Laccaria laccata. Phytopath.* **73**, 390-397.

Theodorou C. 1978. Soil moisture and the mycorrhizal association of *Pinus radiata* D. Don. *Soil Biol. Biochem.* **10**, 33-37.

Theodorou C., Bowen GD. 1971. Influence of temperature on the mycorrhizal associations of *Pinus radiata* D. Don. *Austr. J. Bot.* **19**, 13-20.

Thiery J.P. 1967. Mise en évidence des polysaccharides sur coupes fines en microscopie électronique. *J. Microscopy.* **6**, 987-1017.

Thiery J.P., Raimbourg A. 1974. Cytochimie des polysaccharides. *J. Microscopy.* **21**, 225-232.

Toutain F. 1974. Etude écologique de l'humification dans les hêtraies acidiphiles. Thèse d'Université, Nancy I.

Trappe J. 1962. *Cenococcum graniforme* : its distribution, ecology, mycorrhiza. Thèse d'Université de Washington, *Agriculture, forestry and wildlife.*

Trocme S. 1970. Influence de la fertilisation et de diverses techniques de culture sur l'alimentation des plantes en oligo-éléments. *Ann. Agronomy.* **21**, 519-548.

Udaiyan K., Karthikeyan A., Muthukumar T. 1996. Influence of edaphic and climatic factors on dynamics of root colonization and spore density of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi in *Acacia farnesiana* Willd. And *A. planifrons* W. et. A. *Trees.* **11**, 65-71.

Van Praag H.J., Weissen F., Sougnez-Rémy S., Carletti G. 1985. Aluminium effects on spruce and beech seedlings. II. Statistical analysis of sand culture experiments. *Plant and Soil.* **83**, 339-356.

Van Praag H.J., Sougnez-Rémy S., Weissen F. 1993. L'absorption-translocation spécifique d'éléments nutritifs en relation avec la structure anatomique des radicelles de hêtre (*Fagus sylvatica*) et d'épicea (*Picea abies*). I. Mesures de l'absorption-translocation spécifique. *Belg. J. Bot.* **126**, 175-183.

Valentines R.C. 1961. Contrast enhancement in the electron microscopy of viruses. *Adv. Vir. Res.* **8**, 287.

Vogt K.A., Edmonds R.L., Grier C.C., Piper S.R. 1980. Seasonal changes in mycorrhizal and fibrous-textured root biomass in 23- and 180-year-old Pacific silver fir stands in western Washington. *Can. J. For. Res.* **10**, 523-529.

Voiry H. 1981. Classification morphologique des ectomycorhizes du chêne et du hêtre dans le nord-est de la France. *Eur. J. For. Path.* **11(5/6)**, 284-299.

Watteau F. 1990. Production de sidérophores dans des sols acides et calcimagnésiques et altération de minéraux (oxyhydroxydes, silicates) par des champignons ectomycorhiziens producteurs de sidérophores. Thèse d'Université, Nancy I.

Weyman-Kaczmarkowa W., Pedziwilk Z. 1997. Humidity conditions and the development of fungi in soils of contrasting texture. *Acta Microbiologica Polonica.* **46**, 189-195.

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

Zhu H., Dancik B.P., Higginbotham K.O. 1994. Regulation of extracellular proteinase production in an ectomycorrhizal fungus *Hebeloma crustuliniforme*. *Mycologia.* **86**, 227-234.

Zhu W., Ehrenfeld J.G. 1996. The effects of mycorrhizal roots on litter decomposition, soil biota, and nutrients in a spodosolic soil. *Plant and Soil.* **179**, 109-118.

Zeier J., Schreiber L. 1998. Comparative investigation of primary and tertiary endodermal cell walls isolated from the roots of five monocotyledoneous species : chemical composition in relation to fine structure. *Planta.* **206**, 349-361.

université HENRI POINCARÉ
NANCY 1

FACULTÉ DES SCIENCES

Mademoiselle **GENET Patricia**

DOCTORAT de l'UNIVERSITE HENRI POINCARE, NANCY-I

en BIOLOGIE VEGETALE & FORESTIERE

VU, APPROUVÉ ET PERMIS D'IMPRIMER

Nancy, le 22 mars 1999 n° 181

Le Président de l'Université

CL BURLET

F9

RESUME :

Le travail présenté dans ce mémoire a pour objectif l'étude du rôle des partenaires fongiques des symbioses mycorhiziennes dans la nutrition de la plante hôte, en conditions naturelles.

Deux grands axes ont été privilégiés : l'effet du sol et l'effet des saisons sur les mycorhizes.

Pour cela, deux mycorhizes de Hêtre (*Fagus sylvatica / Cenococcum geophilum* et *Fagus sylvatica / Lactarius subdulcis*) ont été récoltées dans deux sols forestiers naturels de l'Est de la France. Les sites d'étude présentent une végétation arborée similaire (hêtraie) mais se différencient par la nature de leur sol. Il s'agit du site de la Crédence (Forêt de Haye, Meurthe-et-Moselle, N-E France) où le sol est une rendzine brunifiée, de pH de l'ordre de 8. Ce sol est biologiquement très actif (humus de type mull) et très riche en ions calcium. Il a permis d'aborder l'effet des ions calcium sur les mycorhizes. Le deuxième site est celui de Bezange (Forêt de Bezange, Meurthe-et-Moselle, N-E France) qui correspond à un sol podzolique dont le pH est voisin de 4 et qui est biologiquement peu actif (humus de type moder). Ce sol est pauvre en éléments minéraux échangeables et a permis l'étude de l'impact de l'acidité sur les organes symbiotiques. Parallèlement, des racines porteuses de mycorhizes, prélevées en amont des organes symbiotiques, ont été récoltées de manière à appréhender la part de ce qui est absorbé par les champignons puis transmis à la plante.

Le sol a une influence sur le cortège mycorhizien associé au système racinaire du Hêtre, particulièrement sur la proportion des différentes mycorhizes. Ainsi, celles formées par *Cenococcum geophilum* sont dominantes dans le sol calcaire mais peu répandues dans le sol acide. A l'inverse, *Lactarius subdulcis* se développent aisément dans le sol acide mais est rare dans le sol basique.

De plus, le sol pourrait modifier également l'organisation mycorhizienne puisque *Cenococcum geophilum* élabore des ectomycorhizes dans le sol calcaire et alternativement des ectomycorhizes, en hiver dans le sol acide et des associations de type ectendomycorhize le reste de l'année dans ce même sol. L'implication du phosphore et de l'aluminium a été envisagée.

Le comportement vis-à-vis des éléments minéraux du sol des deux champignons mycorhiziens varie en fonction du site. Ainsi, *Cenococcum geophilum* accumule davantage d'ions sur sol calcaire que sur sol acide, alors que *Lactarius subdulcis* présente le comportement inverse. Il semblerait que les champignons jouent un rôle de régulateur de l'absorption des ions lorsque ceux-ci sont présents en abondance dans le sol. En revanche, dans un sol pauvre en éléments minéraux, *Cenococcum geophilum* ne limiterait pas l'absorption ionique et *Lactarius subdulcis* pourrait faciliter cette absorption.

Enfin, une évolution saisonnière a été mise en évidence pour le glycogène fongique, l'azote et dans une moindre mesure pour les éléments minéraux recherchés. Le printemps est caractérisé par une mobilisation des réserves fongiques et une absorption d'ions. Pendant l'été, les nutriments sont assimilés pour assurer la croissance des deux partenaires. Pendant l'automne et au début de l'hiver, les réserves sont progressivement reconstituées.

Mots clé : *Fagus sylvatica*, *Lactarius subdulcis*, *Cenococcum geophilum*, rendzine, sol podzolique, nutrition minérale, saisons.