



Université Sidi Mohamed Ben Abdellah
Faculté des Sciences et Techniques Fès- Saïss
Département de BIOLOGIE



Haut Commissariat aux Eaux et Forêts
et à la Lutte Contre la Désertification
Centre de Recherche Forestière RABAT

PROJET DE FIN D'ETUDE

Master Sciences et Techniques

Biotechnologie microbienne

Contribution à l'étude de l'impact des changements climatiques sur la biodiversité des champignons ectomycorhiziens de la Maâmora

Présenté le : 24 juin 2011

Par : Mlle Fatima-Zahra MAGHNIA

Encadrée par :

FSTF: Dr Naima ELGHACHTOULI

CRF: Dr Salah Eddine BAKKALI YAKHLEF

Devant le jury composé de :

- **Mme. Naima ELGHACHTOULI : Présidente**
- **Mr. Salah Eddine BAKKALI YAKHLEF : Encadrant**
- **Mme. Kawtar FIKRI BENBRAHIM: Examinatrice**
- **Mr. Saad RACHIQ : Examineur**

Année universitaire : 2010/2011

DEDICACE

Je dédie ce travail, avec toute ma gratitude...

...A mes chers parents en témoignage de leur amour, leur affection et de leurs sacrifices ; leurs précieux conseils m'ont guidé dans mes études et, j'en suis persuadée, dans les prochaines étapes de ma vie. Dieu puisse leur accorder santé bonheur et longue vie.

...A ma chère sœur Asmae à qui je souhaite une vie pleine de joie et de réussite. Dieu soit avec elle jusqu'à la fin de son parcours.

...A mon cher frère Yassine que j'aime beaucoup et à qui je souhaite beaucoup de réussite dans ses études et dans toute sa vie.

...A ma chère tante Khadija AROUIAES et à Jihane RACHQA, sa fille en témoignage de mon amour et ma profonde reconnaissance en souvenir de leur hospitalité lors de toute la période de mon stage à Rabat.

...A la mémoire de mes deux grands pères regrettés. Puisse Dieu leur accorder son immense miséricorde

...A mes grands-mères pour leur affection et leurs prières.

...A mes chers oncles et tantes maternels pour leurs soutiens constants.

...A mes cousins et cousines.

...A la grande famille.

...A toutes les personnes que j'aime dans ce monde.

Remerciements

Le présent travail a été réalisé dans le cadre du projet de recherche intitulé : « Impact des changements climatiques sur la biodiversité des communautés telluriques : cas des fourmis et des champignons ectomycorhiziens » - projet piloté conjointement par le Centre de Recherche Forestière et l'Institut pour les Etudes des Ecosystèmes (Italie) dans le cadre de la convention entre le Centre National pour la Recherche Scientifique et Technique (CNRST-Maroc) et le Conseil National de Recherche (CNR-Italie).

Si cette étude est, dans ses limites modestes, tout d'abord redevable à tous les enseignants du département de biologie qui ont contribué efficacement à mon parcours personnel de formation. Tout comme mon projet de fin d'études doit l'être autrement à l'entourage des compétences pédagogiques qui non seulement a bien voulu en adopter l'intérêt et l'opportunité scientifiques mais qui en a accompagné et contribué largement à en parfaire l'élaboration et le développement. Je voudrais dire ici aux uns et aux autres mon estime la plus profonde et ainsi rendre hommage aux personnes sans lesquelles ce travail n'aurait guère vu le jour. En leur disant toute ma reconnaissance pour le dévouement, la qualité de leur écoute et la disponibilité à toute épreuve dont ils ont fait preuve, je voudrais nommer en particulier :

- Mme Naima ELGHACHTOULI pour la haute qualité de son encadrement et son enseignement, sa disponibilité et son dévouement ; ses remarques et consignes ont été du plus grand intérêt. Je vous prie, chère Madame, de trouver ici une modeste expression de la très haute considération que vous méritez aux yeux d'une étudiante.
- Mr Salah Eddine BAKKALI YAKHLEF qui a bien voulu accepter, une seconde fois, de procéder à mon encadrement de stage au sein de son laboratoire de biologie moléculaire. Je voudrais lui exprimer ici toute ma gratitude pour l'aide et le soutien précieux qu'il a bien voulu m'accorder. Je suis très reconnaissante envers lui pour sa grande gentillesse, sa patience et les remarques précieuses dont il a bien voulu entourer mon travail. C'est un honneur pour moi d'avoir pu bénéficier, encore une fois, de sa grande compétence scientifique, et je suis heureuse de lui témoigner mon profond respect.

- Mme Kawtar FIKRI BENBRAHIM, pour la qualité de son enseignement et de sa méthode pédagogique ; je suis vraiment honorée par sa présence dans le jury de soutenance de ce modeste travail.
- Mr Saad RACHIQ, auquel je voudrais exprimer ma très haute considération. C'est un honneur pour moi de vous avoir parmi les membres du jury.
- Mes remerciements vont aussi à tout le personnel du Centre de Recherche Forestière, spécialement Mme Drissia EL KASMI, Mr Aaziz KHRAOUCH et Mr Ben Issa KERDOUH pour leur accueil chaleureux, leur gentillesse et pour toute la disponibilité dont ils ont fait constamment preuve envers moi personnellement comme envers tous les autres stagiaires du Centre.
- Je me dois également de remercier ma collègue stagiaire au laboratoire Mlle Btissam OURID, pour ses grandes qualités d'aimabilité, de gentillesse et pour son soutien moral.

Résumé

Cette étude a pour objectif l'étude de l'impact des changements climatiques sur la diversité des communautés telluriques en l'occurrence des champignons ectomycorhiziens (ECM) associés au chêne-liège de la Maâmora. Une analyse phénotypique et moléculaire de la diversité spatio-temporelle des ECM a été réalisée. L'analyse phénotypique des ECM isolées a montré l'existence de 11 morphotypes (MT) différents, dont l'abondance relative et la distribution sont dépendantes de l'état du milieu ainsi que de la saison de prélèvement. *Cenococcum geophilum* est le morphotype le plus abondant avec une abondance relative atteignant jusqu'à 74 %. Ces MTs ont fait l'objet d'une analyse moléculaire par PCR/RFLP et un séquençage de l'ITS de l'ADN ribosomique. Le produit d'amplification de l'ITS a révélé la présence d'une seule bande électrophorétique pour certains MT et pour d'autres, il a révélé la présence d'au moins 2 bandes. Le poids moléculaire des ITS est en générale compris entre 500 et 1400 pb. L'analyse RFLP, avec les enzymes *EcoRI* et *TaqI* a montré l'existence de 10 types ITS-RFLP distincts. Le séquençage de l'ITS des différents MTs a permis l'identification, outre *C. geophilum*, des champignons ectomycorhiziens du genre : *Peziza*, *Russula*, *Tomentella* et *Scleroderma*.

Mots clés : Changement climatique, *Quercus suber*, champignons ectomycorhiziens, espaceur intergénique transcrit (ITS), PCR-RFLP, séquençage.

SOMMAIRE

INTRODUCTION	1
PRESENTATION DU CENTRE DE RECHERCHE FORESTIERE	4
1- Dénomination, situation.....	4
2- Activités principales du CRF.....	4
3- Missions.....	4
4- Objectifs.....	4
5- Stratégie.....	5
6- Coopération.....	5
7- Organisation.....	5
8- Principaux domaines de recherche.....	5
PREMIERE PARTIE: ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE	7
I-Présentation de Chêne-liège « <i>Quercus suber</i> »	8
1- Taxonomie.....	8
2- Description et caractéristiques.....	8
3- La Subéraie marocaine.....	9
II-Les Mycorhizes.....	11
1-Les champignons ectomycorhiziens.....	12
2-Rôle et fonctionnement de l'ectomycorhize.....	14
a-Nutrition minérale.....	16
b-Alimentation en eau.....	17
c-Production d'hormones.....	17
d-Protection phytosanitaire.....	17
III-Diversité génétique des champignons ectomycorhiziens.....	18
1-Approche classique de l'étude de la communauté des champignons ECM... ..	19
2-Approche actuelle de l'étude de la communauté des champignons ECM.....	20
b-1-Marqueurs moléculaires.....	22
b-2- Application des techniques moléculaires à l'étude des champignons ectomycorhiziens.....	23
IV-Les ectomycorhizes pour un développement durable.....	25

DEUXIEME PARTIE: MATERIELS ET METHODES.....	26
I- Choix des Sites.....	27
II- Diversité phénotypique des champignons ectomycorhiziens.....	28
III- Diversité moléculaire des champignons ectomycorhiziens.....	28
1- Extraction d'ADN par le protocole du Kit Qiagen.....	29
2- Amplification par PCR de l'ITS d'ADN ribosomique.....	29
3- Purification d'ADN à partir du gel par le Kit Qiagen.....	30
4- Polymorphisme de Longueur des Fragments de Restriction (RFLP).....	30
5- Electrophorèse sur gel d'agarose.....	31
a- Préparation du gel.....	31
b- Dépôt des échantillons.....	32
c- Révélation des bandes d'ADN.....	32
6- Analyse des données moléculaires PCR et PCR/RFLP.....	32
7- Quantification et qualification de l'ADN purification par le séquençage.....	33
8- Séquençage d'ADN.....	33
IV- Analyse statistique.....	33
TROISIEME PARTIE: RESULTATS ET DISCUSSIONS.....	34
I- Diversité phénotypique des champignons ectomycorhiziens.....	35
II- Diversité moléculaire des champignons ectomycorhiziens.....	39
1- Amplification de l'ITS.....	39
2- Analyse des résultats RFLP.....	40
3- Distance génétique et arbre phylogénique.....	42
a- Distances génétiques.....	42
b- Relations génétiques entre les ITS de l'ADNr amplifiés des différents morphotypes.....	43
4-Analyse statistique de la diversité.....	44
5-Analyse par séquençage.....	48
CONCLUSION.....	50
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	51

Liste des figures

Figure 1 : Arbres du chêne liège « <i>Quercus suber</i> » dont le liège a été levé du tronc	8
Figure 2 : Mycorhize avec détail de la relation mycélium-radicelle.....	12
Figure 3 : Illustration schématique d'une ectomycorhize en vue éclaté	14
Figure 4 : Schéma représentatif des différentes formes d'ectomycorhizes.....	19
Figure 5 : Schéma représentatif d'un carpophore.....	21
Figure 6 : Représentation schématique de la région de l'ADN ribosomique ITS (Internal Transcribed Spacer) chez les organismes eucaryotes.....	25
Figure 7 : Schéma explicatif de l'aire d'essai	27
Figure 8a : Photos des différents morphotypes d'ectomycorhizes associées au chêne-liège	36
Figure 8b : Photos des différents morphotypes d'ectomycorhizes associées au chêne-liège	37
Figure 9 : Photos de carpophores trouvées sous chêne-liège	38
Figure 10 : Electrophorèse de l'ITS des 10 morphotypes d'ectomycorhizes	39
Figure 11a : Electrophorèse de l'ITS des 15 morphotypes digérés par les enzymes <i>EcoRI</i> et <i>HinfI</i>	40
Figure 11b : Electrophorèse de l'ITS des 15 morphotypes digérés par les enzymes <i>TaqI</i> et <i>MpsI</i>	41
Figure 12 : Dendrogramme (UPGMA) des relations génétique entre les ITS et l'ADNr digéré par <i>EcoRI</i> et <i>TaqI</i> des différents morphotypes	43
Figure 13 : Représentation graphique de l'abondance relative des différents types d'ectomycorhizes dans les deux sites en période d'été et en printemps	45
Figure 14 : Présentation de la diversité des ectomycorhizes analysée par le logiciel R	46
Figure 15 : Dendrogramme phylogénétique des différents morphotypes des champignons ectomycorhiziens du chêne-liège	48

Liste des tableaux

Tableau 1 : liste des enzymes de restriction utilisées et leur site de coupure	31
Tableau 2 : taille de l'ITS et de son produit de digestion des champignons étudiés, obtenue avec les enzymes de restriction <i>EcoRI</i> , <i>TaqI</i> , <i>HinfI</i> et <i>MpsI</i>	42
Tableau 3 : indices de la diversité calculés par la méthode ANOVA.....	47

Introduction

Le Maroc, de part sa position géographique, situé entre la Méditerranée au nord, l'Océan Atlantique à l'ouest et le Sahara au sud, abrite des milieux naturels très variés. Il dispose après la Turquie, de la plus grande richesse floristique en espèces méditerranéennes et est considéré parmi les régions ayant une forte concentration d'endémisme (Ezzahi et al. 2006). Ce patrimoine joue un rôle vital pour l'économie, l'écologie et la vie sociale. Près du tiers du domaine forestier qui couvre quelque 9 525 400 ha, soit 12 % du territoire national, est constitué de forêts productives. Le reste est constitué de forêts de protection et de récréation. Les produits fournis par la forêt marocaine sont innombrables : fruits, champignons, liège, huiles, bois... (EL Asri et al., 1996).

Parmi les essences forestières rencontrées, on trouve le chêne liège. Cet arbre s'étend sur une superficie de près de 350 000 ha, principalement dans les régions de la Maâmora - la plus vaste des subéraies du Maroc et du monde-, du Plateau central et du Rif (Hammoudi, 2002).

Représentant 15 % de la superficie mondiale des subéraies, les subéraies marocaines génèrent, rien que par la production de liège, l'équivalent de 15 millions de dollars U.S., soit près de 40% des recettes annuelles générées par la commercialisation des produits forestiers locaux. Elles assurent l'activité à 45 entreprises de récolte de liège et à 13 unités industrielles de transformation et de valorisation de ce produit. 95% de la production marocaine de liège est destinée à l'exportation.

Sur le plan social, les subéraies marocaines connaissent une grande activité pastorale dont la valeur du produit en viande est équivalente à celle des produits bois et liège. Les activités d'exploitation de bois et de liège génèrent environ 375.000 journées de travail par an. En plus, la production non ligneuse représente annuellement l'équivalent de 5 mille tonnes de glands doux, 115 tonnes de champignons et 2 milles tonnes de miel ...

Or, ces subéraies sont des écosystèmes fragiles, caractérisées par la présence de sols souvent pauvres en matière organique et éléments minéraux, et sont soumises à des agressions diverses liées aux contraintes climatiques (sécheresse, pluviométrie erratique, etc.), une surexploitation (défrichements, exploitations abusives, surpâturage écimage, etc.) ainsi que des attaques parasitaires notamment des défoliateurs et d'agents pathogènes. Ceci a conduit à une régression, de plus en plus accentuée, marquée par la rareté de la régénération naturelle et des phénomènes de dépérissement d'origine complexe (Sbay et al. 1994), engendrant ainsi des problèmes plus graves comme l'érosion intense des sols, la baisse des productivités forestières et pastorales, la désertification galopante, la baisse de la biodiversité et des ressources génétiques (Ezzahiri et al., 2006). Les activités humaines en général et les pratiques sylvicoles en particuliers sont des facteurs qui peuvent considérablement perturber les milieux forestiers et leur biodiversité. Toutefois, les perturbations d'origine humaine (dépressage, éclaircie, ...) peuvent avoir des effets positifs sur la diversité biologique (Ezzahiri et al. 2006).

Le recours à des techniques de conservation et de restauration écologiques s'est imposé pour satisfaire les demandes nationales en bois et pour lutter activement contre les risques d'érosion et de désertification qui menacent directement la fertilité des sols provoquant des baisses de rendements agricoles, l'envasement des barrages, etc.

Dans ce contexte, les services forestiers ont mis en place différents programmes de conservation et d'entretien de ces espaces forestiers, visant à les réhabiliter en réalisant des plantations ou en mettant en défens certaines parcelles afin de protéger le couvert arboré contre le bétail, en plus de la mise en place des programmes d'amélioration génétique, de régénération artificielle, de création des aires protégées.

Or, dans toutes ces actions, le rôle de la microflore tellurique, en particulier celui des champignons mycorhiziens, sur le cycle végétatif de l'essence forestière principale, le Chêne-liège, a rarement été pris en compte. En effet, l'alimentation hydrominérale de la majorité des espèces ligneuses des forêts méditerranéennes, tempérées et boréales est en grande partie dépendante de leur cortège mycorhizien. Il est maintenant parfaitement établi que ces microorganismes interviennent significativement dans tous les stades de développement des espèces forestières et sont indispensables au développement des essences ectotrophes du genre *Quercus* (Smith et Read, 1997 ; Dickie et al., 2002, 2004).

Dans le contexte des changements climatiques, le CRF se propose de faire un inventaire exhaustif des champignons ectomycorhiziens et de certains hyménoptères (fourmis) des subéraies connaissant différents niveaux de dégradations et de perturbation afin d'évaluer l'évolution spatio-temporelle de ces êtres vivants.

Ce travail, mené dans le cadre d'un projet de recherche piloté par le Centre de la Recherche Forestière de Rabat (CRF) (Maroc) en coopération avec le Conseil National de la Recherche (CNR) (Italie), contribuera à :

- i). Définir l'impact des différentes perturbations sur la structure des communautés des champignons ectomycorhiziens et des fourmis ;
- ii). Déterminer les espèces qui résistent le mieux au stress ;
- iii). Identifier les espèces de champignons ectomycorhiziens et de fourmis bio-indicateurs de la qualité des écosystèmes forestiers.

Par ailleurs, le but attendu de ce projet est la sélection d'isolats de champignons mycorhizogènes d'intérêt biotechnologique conférant à la plante hôte la capacité de tolérer des conditions stressantes.

Au cours de mon stage, j'ai été chargé du volet concernant la diversité des communautés de champignons ectomycorhiziens. Nous proposons d'étudier l'évolution spatio-temporelle des communautés de champignons ectomycorhiziens du chêne-liège de la forêt de la Maâmora. Notre objectif est de déterminer à quel point l'anthropisation combinée aux conditions climatiques peuvent influencer la biodiversité microbienne, et donc indirectement la résilience du peuplement forestier face aux contraintes environnementales.

L'étude de la biodiversité spatio-temporelle des champignons ectomycorhiziens associés au chêne-liège a été faite par une caractérisation macroscopique suivie d'une identification de ces partenaires fongiques par l'outil de la biologie moléculaire, PCR

(Réaction de polymérisation en Chaîne), RFLP (Polymorphisme de Longueur des Fragments de Restriction) et séquençage de l'espaceur interne transcrit (ITS) de l'ADN ribosomique.

Aperçu sur le Centre de Recherche Forestière

1- Dénomination, Situation

En 1945, un institut de recherche a été créé : c'est la Station des Recherches Forestières de Rabat, qui est devenue en 1992 le Centre National de la Recherche Forestière et en 1998, la Division de Recherche et d'Expérimentations Forestières. A partir de 2005 le centre a changé d'application et il est nommé : Centre de Recherche Forestière (CRF).

2- Activités principales du CRF

- La connaissance du milieu forestier, des écosystèmes et des filières (bois, plantes aromatiques et médicinales, chasse et pêche, protection de la nature, etc....).

- La maîtrise des techniques culturales des principales espèces productives, en particulier le chêne-liège, le cèdre, le pin et les eucalyptus.

3- Missions

- Procéder aux études scientifiques, techniques et économiques ayant pour objet la conservation, le développement et la valorisation des ressources forestières.
- Effectuer des études prospectives, en particulier celles qui portent sur le milieu naturel, la flore et la faune sauvage.
- Adapter les techniques acquises en matière de foresterie au niveau international et national et en assurer le transfert vers les différents partenaires.
- Coordonner l'action du Haut Commissariat aux Eaux et Forêts et à la Lutte Contre la Désertification en matière de documentation forestière (HCEFLCD).

4- Objectifs

- Amélioration de la productivité forestière.
- Identification des critères et des indicateurs de gestion durable des ressources naturelles.
- Valorisation des produits de la forêt.

5- Stratégie

- Programmation au long terme, par espèces ou systèmes et disciplines.
- Orientation et coordination des activités de recherches forestières.

6- Coopération

Le CRF a établi des relations de coopération avec des institutions nationales et internationales de recherche, de formation et de financement des travaux scientifiques.

7- Organisation

Le CRF est organisé en quatre services :

- Service de Génétique et Amélioration des arbres forestiers.
- Service de Technologie du Bois et des Produits Forestiers.
- Service d'Ecologie, d'Erosion, de Biodiversité et de Conservation des Sols.
- Service de Sylviculture et Santé des Forêts.

8- Les principaux domaines de recherches

➤ **Activités du Service Sylviculture et Santé des Forêts**

- Détermination des techniques culturales des espèces naturelles et de reboisement.
- Estimation de la croissance et de la productivité des essences forestières.
- Amélioration de la qualité des plantes par mycorhization et par la fertilisation.
- Entomologie (Etude des insectes ravageurs des arbres forestiers).

➤ **Activités de génétique forestière**

- Evaluation des possibilités d'adaptation des espèces et provenances exotiques et indigènes.
- Caractérisation de la variabilité génétique des essences marocaines.
- Etablissement de vergers à graines à partir de semis ou de clones issus d'arbres sélectionnés.

➤ **Protection de la forêt**

- Identification et étude des champignons pathogènes dans les différents peuplements naturels et de reboisement.
- Etude de la bio-écologie et du cycle biologique des insectes xylophages.

➤ **Valorisation des produits forestiers**

- Amélioration des techniques d'exploitation des produits de la forêt.
- Détermination des caractéristiques technologiques des bois et liège et promotion de leurs utilisations.
- Estimation des potentialités et valorisation des ressources aromatiques et médicinales.

➤ **Erosion et climatologie**

- Quantification de l'érosion et élaboration de méthodes de lutte.
- Développement d'indicateurs de lutte contre la désertification et des changements climatiques.
- Optimisation et rationalisation du réseau climatologique forestier.

➤ **Ecologie et biodiversité**

- Suivi des populations de la faune sauvage.
- Etude de l'évolution des écosystèmes naturels.
- Suivi des populations par la chasse.
- Suivi de la biodiversité dans les aires protégées et vulgarisation des résultats concernant sa richesse

➤ **Recherche en zones arides**

- Réhabilitation des zones arides et lutte contre la désertification.
- Amélioration des techniques sylvopastorales dans les zones arides.

Première partie

Etude bibliographique

I- Présentation du Chêne-liège «*Quercus suber*»

1- Taxonomie

Le chêne liège est un [arbre](#) à feuilles persistantes du [genre](#) *Quercus* (le [chêne](#)), appartenant à la famille des [Fagacées](#) (anciennement *Cupulifères*), exploité pour son [écorce](#) qui fournit le liège (figure 1).



Figure 1 : Arbres du chêne-liège (*Q.suber*) dont le liège a été levé du tronc.

2- Description et caractéristiques

C'est une espèce extrêmement polymorphe comme la plupart des chênes ; elle est caractérisée par la formation subéreuse de son écorce donnant le liège. Le chêne-liège est un arbre généralement de taille moyenne pouvant atteindre 7 à 10 m de hauteur lorsqu'il est en peuplement. A l'état isolé par contre, il peut atteindre jusqu'à 20 à 25 m de hauteur. Le chêne-liège est fortement enraciné, son pivot, sur sol suffisamment perméable, atteint plusieurs mètres de profondeur. Il peut vivre longtemps ; sa longévité moyenne est de 130 à 150 ans.

Cette essence pousse à une altitude très variable allant de 0 à 1200 m et même 2200 m (Atlas marocain).

Les feuilles de forme assez ovale sont dentées sur les bords ; elles sont vertes, luisantes sur la face supérieure, alors que la face inférieure est blanchâtre et tomenteuse. Elles portent 5 à 7 paires de nervures latérales peu saillantes.

Les fleurs jaunâtres s'épanouissent vers Avril-Mai ; les fleurs mâles, en chatons, et femelles, minuscules, sont séparées sur le même pied.

Le gland, fruit du chêne liège, est trapu et arrondi au sommet, sa longueur est comprise entre 2,5 et 3 cm. Les glands sont enveloppés sur la moitié de leur longueur par les cupules et sont réunis par deux sur des pédoncules courts et renflés. Les premiers glands apparaissent vers l'âge de 15 ans. A l'automne, les glands tombent sur le sol et au printemps suivant les premières chaleurs activent le gland encore humide des dernières pluies d'hiver et la germination commence.

Pour sa répartition géographique, c'est une espèce typiquement méditerranéenne dont l'aire est limitée au bassin occidental de la méditerranée, Maroc, Algérie, Tunisie, Italie, France, Espagne et aux côtés Atlantiques du Maroc et du Portugal.

Le chêne-liège forme la forêt climax sur sol non calcaire dans les régions ayant une tranche pluviométrique minimale de 600 m. Subhumide et per humide, quelques ilots se trouvent dans le climat semi-aride en Tunisie alors qu'au Maroc le chêne-liège y est régulièrement représenté y compris dans l'étage semi-aride à cause de l'influence atlantique.

3- La subéraie marocaine

Le chêne-liège constitue pour le Maroc une essence forestière des plus intéressantes. Son domaine se compose d'îlots forestiers et comprend trois groupes principaux : i) la région côtière avec comme forêt importante la Maâmora; ii) la région de moyenne altitude et iii) la région montagneuse.

Le chêne-liège est très apprécié par la population pour la diversité de ses produits. En effet, en plus du liège et du bois, ces subéraies produisent et disposent d'un feuillage abondant, très apprécié par le bétail notamment en période de disette. Son sous bois à base d'arbustes constitue un refuge privilégié pour la faune sauvage.

Pour la production fourragère, le sous bois des subéraies est reconnu par sa richesse en plantes pastorales (graminées et légumineuses). Cette production est enrichie par les glands, consommés par le bétail et la faune cynégétique, ainsi que par les prélèvements des branches effectués directement par les éleveurs pendant les périodes de sécheresse et de disette.

En plus, les subéraies produisent des champignons de qualité, notamment les truffes, des glands doux pour la consommation humaine surtout en Maâmora, des lichens, du miel, des plantes aromatiques et médicinales et attirent par leur richesse cynégétique un nombre important de chasseurs de petit et gros gibier.

La diversité et la beauté des paysages forestiers en général et des subéraies en particulier, la richesse et la qualité du patrimoine culturel et la douceur du climat sont autant de facteurs qui contribuent au développement d'une activité économique touristique en croissance permanente.

La forêt de la Maâmora, est située à proximité de trois grandes villes (Rabat/Salé, Kénitra et Khémisset), signifiant « la fructifère » et l'origine de ce nom proviendrait de la qualité exceptionnelle des glands doux de ses chênes, se développe depuis la frange atlantique jusqu'à 80 km à l'est. Elle repose sur des terrains primitifs constitués de substrats marneux du Miocène et gréseux du Pliocène, recouverts de sables sur argiles. Ce type de sol acide est celui électif de *Quercus suber*, exigeant toujours des terrains pauvres en calcaire actif.

Par ailleurs, la strate arbustive des subéraies de montagne en particulier, constitue l'une des principales sources de bois d'énergie destiné à la consommation domestique et au fonctionnement des briqueteries et des fours à chaux. La souche de bruyère, assez abondante en zones de montagne, a été exploitée, il n'y a pas longtemps, pour la production des ébauches de pipes.

Dans la forêt de la Maâmora, on constate un développement continu et non organisé de la fréquentation touristique qui atteint un niveau de 30.000 visiteurs par semaine avec plus de 3.000 véhicules. Cette activité risque de nuire à la forêt si les mesures ne sont pas prises à temps pour l'organiser et la développer d'une manière durable.

La Maâmora qui relève de l'étage thermoméditerranéen, se caractérise par la seule association du *Telino linifoliae-Quercetum suberis* qui, sous l'effet des nombreux facteurs de dégradation, a cédé la place à des formations préforestières et de matorrals à base d'espèces arbustives. Cette évolution régressive s'est traduite par une réduction de la densité du chêne liège, ce qui a donné lieu à l'apparition de matorrals à *Cistus salviifolius*, *Halimium halimifolium*, etc. parsemés de quelques arbres de chêne liège et à l'apparition, dans le cas général de la régression, de formations denses de chêne liège sans strates arbustive et herbacée. Ceci signifie que ces formations sont

dans une situation non favorable à leur production, leur renouvellement et leur pérennité.

Donc, l'état actuel de cet écosystème forestier, comme celui de la plupart des forêts du globe, est le produit d'interactions entre les activités humaines (pratiques agro-sylvo-pastorales et aménagements récents), la dynamique naturelle de la végétation (expansion, dégradation, adaptation, résilience ...) et l'influence momentanée des perturbations naturelles (vents, feux, sécheresse,...).

II- Les mycorhizes

Le terme mycorhize vient de l'association de deux mots grec, mykes = champignon et rhiza = racine. Les mycorhizes sont des associations symbiotiques contractées par les racines des végétaux avec certains champignons du sol. Il y a près de 400 millions d'années, l'invasion de la terre ferme par les végétaux a été un succès grâce à l'association symbiotique entre les plantes terrestres et des champignons (Kendrick, 1992). Habités aux milieux aquatiques, les végétaux primitifs baignaient constamment dans un bouillon nutritif et n'avaient qu'à absorber les éléments minéraux par diffusion. Lors de l'apparition des continents, les systèmes racinaires des plantes n'étaient pas assez efficaces pour combler leur besoin en eau et en éléments minéraux dans le cas d'une éventuelle colonisation de la terre ferme.

Il y a près de 2000 ans, Théophraste avait déjà remarqué la curieuse disposition de certaines espèces de champignons au voisinage des racines d'essences forestières. Ce n'est cependant qu'en 1885 que Frank (Boullard, 1968) décrit le complexe de la mycorhization, qu'il crée le mot «mycorhizien » et qu'il explique les relations entre les deux organismes associés, et sans oublier les écrits de Pfeffer (Boullard, 1968) qui supposa le premier, en 1877, que les champignons associés aux racines de divers arbres devaient servir de convoyeurs de substances tirées de l'humus au bénéfice de la plante hôte. La connaissance des champignons mycorhiziens est donc relativement récente. De grandes découvertes ont été faites, cependant de très nombreux points restent à éclaircir au sujet de cette importante association. Ces symbioses mycorhiziennes sont omniprésentes dans notre environnement naturel, mais insuffisamment utilisées en agriculture moderne.

Les mycorhizes favorisent l'absorption par les racines des éléments minéraux, grâce aux hyphes extramatriciels, de la rhizosphère et du sol et améliorent ainsi la nutrition de la plupart des espèces végétales. En retour, le végétal fournit le carbone nécessaire, sous forme de sucres issus de la photosynthèse, à son partenaire fongique hétérotrophe. Les structures générées par l'association mycorhizienne peuvent être classées sur la base de critères écologiques, morphologiques et physiologiques. Il existe différents types de mycorhizes, mais ce travail porte plus particulièrement sur: **les Ectomycorhizes.**

1- Les champignons ectomycorhiziens

Les mycorhizes ectotrophes, ou ectomycorhizes, bien qu'elles ne concernent que 3 à 5% des espèces végétales terrestres, d'une importance forestière considérable, mais un nombre d'espèces relativement variés. Elles ont une spécificité plus ou moins étroite d'hôte végétal et de sol. Elles présentent un intérêt pour la production de champignons comestibles et un intérêt forestier. Un dixième des macromycètes serait des champignons mycorhiziens (Senn-Irlet et al., 2007). Plusieurs espèces ectomycorhiziennes peuvent coexister autour des racines d'un même arbre voire autour d'une même racine (Durrieu, 1993). En revanche, beaucoup d'espèces fongiques (comme les espèces du genre *Suillus*) sont spécifiques à une essence. Les mycorhizes sont très sensibles aux pluies acides et aux pratiques sylvicoles : traitements chimiques, tassement du sol, mécanisation, engrais minéraux... qui provoquent leur disparition (Courtecuisse, 2000). Elles sont directement reconnaissables en observant sous la loupe binoculaire des systèmes racinaires mycorhizés.

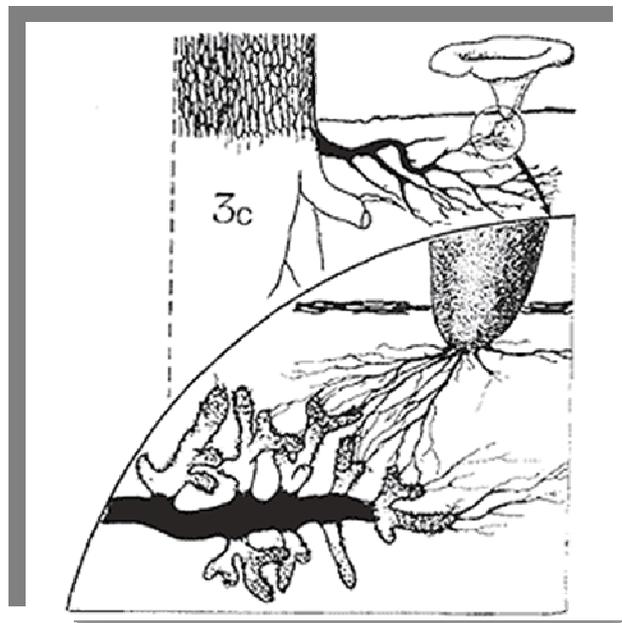


Figure 2 : mycorhize avec détail de la relation mycélium-radicelle

La symbiose ectomycorhizienne entre racines des végétaux ligneux et champignons concerne la plupart des essences forestières des zones tempérées (bouleaux, chênes, hêtres, peupliers, pins, sapins...) et de nombreuses espèces fongiques, Ascomycètes et Basidiomycètes, dont certaines bien connues (amanites, bolets, truffes...). Cette association conduit à des échanges bidirectionnels d'éléments nutritifs entre les partenaires et améliore la nutrition hydrominérale et la résistance au stress des arbres. Il est aujourd'hui admis que l'aptitude à la symbiose ectomycorhizienne est apparue plusieurs fois indépendamment au cours de l'évolution au sein du groupe des champignons.

Molina *et al.* (1992) estiment qu'il existerait entre 5000 et 6000 espèces de champignons capables de former des ectomycorhizes. Malgré cette grande diversité, la structure d'une ectomycorhize est généralement conservée. Les ectomycorhizes sont des associations où le mycélium progresse entre les cellules du cortex racinaire pour former le réseau intercellulaire de Hartig. Le mycélium progresse entre les cellules corticales mais ne pénètre pas dans les cellules vivantes. L'ectomycorhize se concrétise chez la plupart des végétaux ligneux par la formation de tissus spécialisés (manchon fongique pseudoparenchymateux, réseau intercellulaire de Hartig). Au niveau anatomique, l'ectomycorhize est constituée (figure 3):

- des hyphes extramatriciels, établissent le lien entre manteau et la rhizosphère, se propageant dans le milieu extérieur et assumant un rôle essentiel d'exploration et d'absorption,
- des hyphes étroitement agglomérées et formant un pseudoparenchyme et constituant le manchon mycélien ou manteau gainant la racine,
- des hyphes du réseau de Hartig qui s'insinuent entre les cellules du cortex racinaire sans jamais pénétrer dans les cellules de l'hôte ; c'est à leur niveau que sont supposés s'effectuer les échanges d'éléments nutritifs (sucres, acides aminés, éléments minéraux).

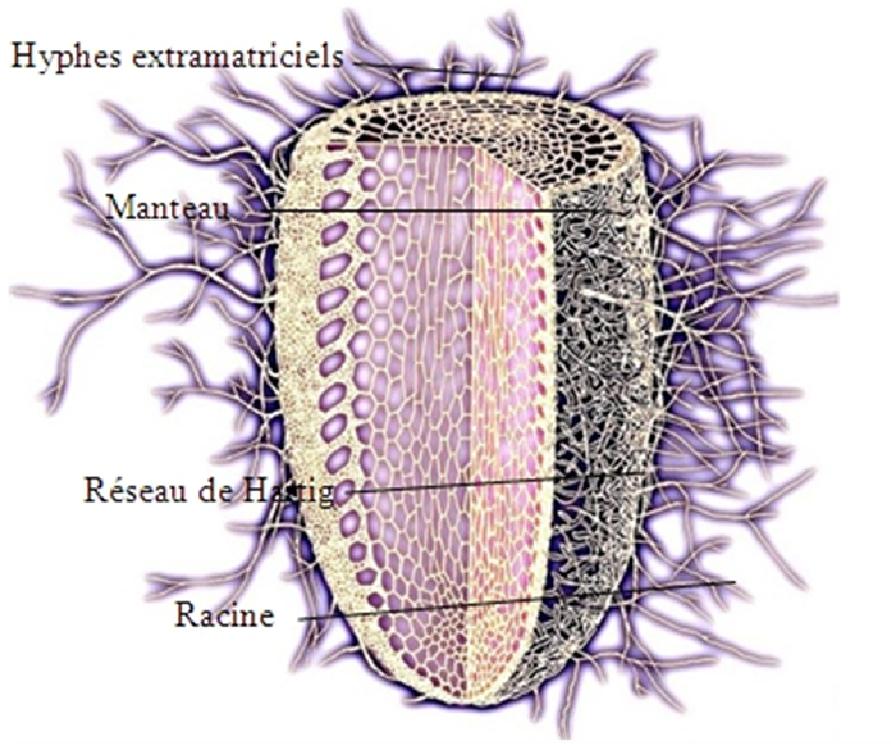


Figure 3 : Illustration schématique d'une ectomycorhize en vue éclatée

Dans le détail, il existe une grande variabilité de la structure du manteau et du réseau de Hartig. Le manteau et les hyphes extramatriels varient par leur couleur et leur texture.

2- Rôle et fonctionnement général de l'ectomycorhize

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

relations nutritionnelles entre les symbiotes sont basées sur deux caractéristiques essentielles.

Premièrement, l'hyphe progressant dans le sol absorbe, le plus souvent de façon active, les ions minéraux qui sont alors transportés par le mycélium ou les rhizomorphes vers la racine-hôte. L'absorption des éléments minéraux peu mobiles dans le sol (phosphate, potassium...) ou adsorbés sur les particules du sol (ammonium...) est particulièrement dépendante de ce mécanisme. En effet, ces ions sont rapidement absorbés par la racine en croissance et il se forme dans la rhizosphère de celles-ci une zone de déplétion conduisant à des carences minérales. L'absorption de la racine est alors fonction de l'approvisionnement en éléments minéraux de la région péri-racinaire par diffusion des ions dans le sol plutôt que des besoins réels des tissus racinaires. Les vitesses de transport des métabolites le long du mycélium ectomycorhizien sont plus élevées que les taux de diffusion des ions dans le sol et de ce fait les hyphes restaurent un approvisionnement normal du système racinaire.

La fourniture, par la plante-hôte, de composés carbonés au champignon associé constitue la seconde caractéristique des relations nutritionnelles entre champignons ectomycorhiziens et racine. Harley et Smith (1983) ont souligné que ces échanges de nutriments ne s'effectuaient qu'entre les cellules vivantes et en contact étroit. Cette condition n'est remplie que pendant une période limitée du développement de la symbiose et dans une région racinaire restreinte : la zone d'infection mycorhizienne. Avant ce stade de développement le contact entre les partenaires est réduit et après celui-ci les cellules de la racine et/ou du champignon sont en phase de sénescence.

Le succès d'une association symbiotique, qu'il soit défini en termes d'évolution ou de physiologie, nécessite un degré élevé de coordination intercellulaire et de corégulation métabolique aboutissant à la mise en place de caractéristiques spécifiques de la symbiose à différents niveaux de l'organisation symbiotique. Cette coordination entre les partenaires est indispensable si une association à long terme doit s'établir. Ces quarante dernières années, nos connaissances sur la physiologie et le fonctionnement de la symbiose ectomycorhizienne se sont considérablement accrues (Harley & Smith, 1983 ; Smith & Read, 1996). Ces travaux ont permis de comprendre les mécanismes d'absorption, d'accumulation et de transport du phosphate, de l'azote et des sucres dans les ectomycorhizes. Les approches génétiques et moléculaires ont permis de démontrer

que le développement et le fonctionnement des ectomycorhizes étaient sous le contrôle métabolique et génétique des deux partenaires. Ce contrôle s'exerce sur :

- les processus de reconnaissance plante-hôte-champignon,
- la pénétration et l'infection des tissus racinaires,
- la morphologie de la racine (prolifération des racines latérales, allongement radiale des cellules rhizodermiques) et des tissus fongiques (formation du manteau et du réseau de Hartig),
- la réorganisation du métabolisme des symbiotes,
- la régulation du fonctionnement de l'ectomycorhize et l'intégration de ce nouvel organe dans la biologie de la plante entière.

La plupart des recherches appliquées effectuées à ce jour renforce l'idée que l'application rationnelle des mycorhizes, en vue d'améliorer la production forestière passe par l'introduction d'un matériel végétal biologiquement et/ou génétiquement modifié. Il existe un réservoir inexploré de souches fongiques mycorhiziennes, souvent mal connues sur le plan taxonomique.

a- Nutrition minérale

Les champignons mycorhiziens sont tous hétérotrophes pour le carbone et la plupart le sont pour les vitamines telles que la thiamine et la biotine. Pour la grande majorité de ces champignons, la source essentielle de carbone est fournie par la plante-hôte sous forme de saccharose, glucose et fructose, mais certaines espèces utilisent des protéines et des complexes polymérisés, comme la cellulose, la lignine. Quand le champignon n'est pas associé à la plante-hôte, sa capacité à dégrader les composés macromoléculaires, comme la lignine, est limitée. Il semblerait toutefois que la capacité de celui-ci à assimiler les protéines a été largement sous-estimée. Les plantes sont limitées dans leur croissance par leur incapacité à optimiser le prélèvement par les racines des éléments minéraux du sol, comme le phosphore et l'azote. Les ectomycorhizes stimulent généralement la croissance et le développement de la plante-hôte, en particulier dans les sols forestiers où la disponibilité en éléments minéraux est faible (1-10 μM). Cette stimulation de la croissance se traduit, en particulier, par l'augmentation des teneurs en phosphore et en azote des arbres mycorhizés. Or, il est

connu que dans les sols forestiers, l'azote et le phosphore sont les deux principaux facteurs limitant la croissance des arbres.

La surface d'absorption par les racines de tous ces éléments est très fortement augmentée par la présence du mycélium tout autour des racines. Les hyphes mycéliens peuvent s'étendre assez loin du système racinaire. Des expériences réalisées avec du phosphore radioactif ^{32}P , ont démontré que les hyphes mycéliens absorbent le phosphore à plus de 7 cm de la racine, dans le cas des endomycorhizes, et à 10 cm, ou plus, dans le cas des ectomycorhizes.

Cependant, si la symbiose mycorhizienne est caractérisée par un flux d'éléments minéraux dans le sens champignon-arbre, il ne faut pas oublier qu'elle est définie également par un flux de photosynthétats dans le sens arbre-champignon. Les champignons ectomycorhiziens jouent également un rôle important dans l'absorption, le transfert ou l'immobilisation d'autres éléments minéraux du sol, comme le cuivre, le fer, le zinc et le potassium. Des métaux lourds, parfois présents en excès dans certains sols acides (aluminium, cadmium, zinc), sont absorbés et accumulés par les cordons mycéliens qui les piègent. Cette faculté fait de ces champignons de bons détoxificateurs des sols.

b- Alimentation en eau

Les études morphologiques ont montré que les structures mycéliennes sont bien adaptées aux mouvements de l'eau entre les champignons et les plantes. Les rhizomorphes ont, en particulier, des grands éléments conducteurs possédant peu de cloisons transversales et pratiquement dépourvus de cytoplasme. Ce système est bien adapté au transport des solutés sur de longue distance et assure les inter-connections entre différentes plantes. L'infection mycorhizienne peut augmenter l'adaptation des plantes aux conditions de sécheresse. L'effet bénéfique de la mycorhization dans l'alimentation hydrique de la plante-hôte est en partie lié au vaste réseau d'hyphes qui prospectent le sol augmentant ainsi la surface de contact entre le sol et le système racinaire. Mais il existe également des mécanismes indirects comme le contrôle de la régulation stomatique et l'ajustement osmotique de la plante par le champignon.

c- Production d'hormones

L'association mycorhizienne joue un rôle dans la synthèse de composés complexes, comme les vitamines et les phytohormones. Certaines molécules synthétisées par la plante stimulent le développement du champignon (formation du carpophore, maturation des organes de reproduction). Un effet rhizogène du champignon a été mis en évidence par Slankis et Gay. Il est dû à son aptitude à produire des composés hormonaux et notamment de l'acide indole-3-acétique (AIA). Les auxines produites par le champignon interviennent probablement dans l'établissement de l'association symbiotique en stimulant la formation de racines courtes réceptives à l'infection. De plus, les phytohormones produites par le champignon sont exportées vers la plante-hôte et affectent la croissance du système racinaire, du tronc, des tiges et des feuilles.

d- Protection phytosanitaire

La modification de l'environnement rhizosphérique par le symbiote fongique influence le développement des autres micro-organismes, incluant les pathogènes. L'association mycorhizienne peut également jouer un rôle indirect sur la croissance de la plante-hôte en affectant la microflore des sols, sur les autres micro-organismes du sol et surtout sur les micro-organismes pathogènes. L'association symbiotique est un moyen de lutte biologique contre les organismes pathogènes telluriques. Les exsudats racinaires sont modifiés par la présence du champignon qui les utilise pour ses propres besoins nutritionnels, réduisant d'autant la teneur en substrats carbonés simples du milieu rhizosphérique. Par ailleurs, le manteau fongique peut jouer le rôle d'obstacle mécanique difficile à franchir pour certains micro-organismes. De plus le champignon synthétise des inhibiteurs du développement de certains micro-organismes du sol (*Rhizoctonia praticola*, *Phytophthora cinnamoni*) et contribue à l'augmentation de la résistance des plantes par divers mécanismes. Enfin et surtout, de très nombreux champignons ectomycorhiziens sont capables de produire des substances antibiotiques (chloromycorrhizin A, mycorrhizin A) qui peuvent protéger la plante-hôte.

III- Diversité génétique de champignons ectomycorhiziens

Le polymorphisme est une caractéristique souvent étudié en biologie. Que ce soit pour différencier des populations d'organismes, déterminer les pathovars, cibler des populations naturelles pour en apprécier les relations et donc les distances génétiques ou déterminer

l'écotype. Les critères utilisés peuvent être agronomiques, biochimiques, phénotypiques, ou moléculaires.

Les champignons ectomycorhiziens peuvent se présenter sous trois entités distinctes : d'abord sous sa forme la plus connue, le carpophore (aussi appelé fructification) (i); sous forme d'un organe mixte néoformé plante-champignon, la mycorhize (ii); puis sous forme de mycélium (iii) (Figure 4). Ces trois entités ont été utilisées dans le temps pour l'étude des communautés et des populations ectomycorhiziennes.

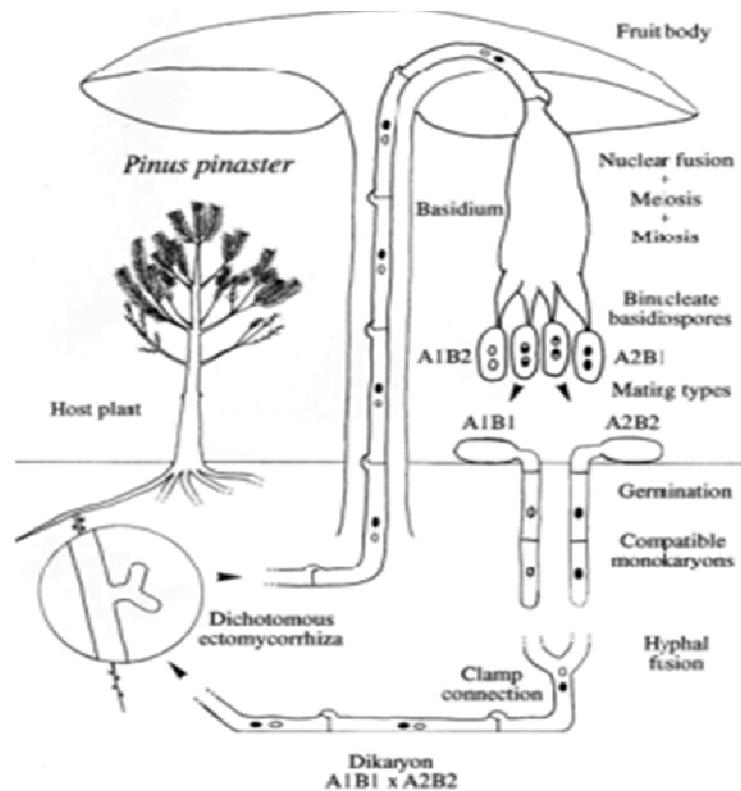


Figure 4 : Schéma représentatif des différentes formes d'ectomycorhizes

1- Approche classique de l'étude de la communauté des champignons ECM

Cette approche consiste à recueillir tous les carpophores présents en surface. Plusieurs auteurs (ex. Mehus, 1986 ; Brandbrud, 1987 ; Kalamees et Silvers, 1988 ; Arnolds, 1991 ; Brunner *et al.*, 1992 ; Egli et Ayer, 1997 ; Gardes et Bruns, 1996a) ont utilisé cette technique aisée, peu destructive et à identification relativement facile.

Cependant, une première contrainte s'impose puisque plusieurs champignons ectomycorhiziens, de type Asco- ou Basidio-mycètes, produisent des carpophores hypogés tel que les truffes et les *Rhizopogon* sp. Leur prise en compte est toutefois possible (Fogel, 1981), quoique plus laborieuse et plus dommageable pour le sol. De plus, la fructification est un processus complexe qui est dépendant de plusieurs facteurs et dont le déterminisme varie selon les espèces (Vogt *et al.*, 1992 ; Gardes et Bruns, 1996a ; Dahlberg *et al.*, 1997 ; Gehring *et al.*, 1998 ; Jonsson *et al.*, 1999). Les variations climatiques (sécheresse) peuvent diminuer la fructification (Wasterlund et Ingelög, 1981). L'âge du peuplement (Jansen et De Nie, 1988) et les traitements sylvicoles comme la fertilisation (Garbaye et Le Tacon, 1982 ; Peter *et al.*, 2001) ou l'éclaircie (Egli et Ayer, 1997) affectent également la fructification.

De nombreuses études comparatives ont démontré que les carpophores reflètent mal les populations souterraines (Henrion *et al.*, 1994 ; Mehmman *et al.*, 1995 ; Gardes et Bruns, 1996a ; Karen, 1997 ; Pritsch *et al.*, 1997). Ils ont découvert que plusieurs espèces fructifient abondamment, mais forment peu de mycorhizes (Gardes et Bruns, 1996a) alors que d'autres semblent fructifier que très peu ou pas du tout, comme le *Cenococcum geophilum* qui malgré cela, est un champignon cosmopolite et très présent sous forme de mycorhizes (Danielson et Pruden, 1989). En bref, la présence de carpophores doit être associée automatiquement à la présence de mycélium, mais l'absence de carpophores ne signifie pas nécessairement l'absence de mycélium.

2- Approche actuelle de l'étude de la communauté des champignons ECM

a- Diversité phénotypique

La plupart des champignons supérieurs possèdent un chapeau à lames et un pied (stipe). Certaines espèces plus évoluées, comme l'amanite, portent un anneau et une volve.

Afin de classer les différentes espèces de champignons, les spécialistes se basent sur les caractéristiques des carpophores (fructification) (Figure 5).

- La forme du chapeau: bien que souvent ronde, elle peut être plus ou moins sphérique, en cloche, plate, mamelonnée ou en entonnoir et son revêtement peut être lisse, soyeux, ridé, pelucheux, etc.
- L'hyménium peut être: lisse, plissé, lamellé, aiguillons ou poré.
- l'insertion de l'hyménium sur le pied peut être: décurrent, adné, libre, ...
- Le stipe (ou pied) peut être lisse, fibrilleux, avec ou sans anneau, cortiné, avec ou sans volve, cylindrique, ventru, bulbeux ou pointu, plein ou creux, etc.
- La couleur de la chair peut être blanche ou colorée, se colorant au toucher ou à la coupe.
- L'odeur : chaque espèce possède une odeur caractéristique.
- La couleur des spores.

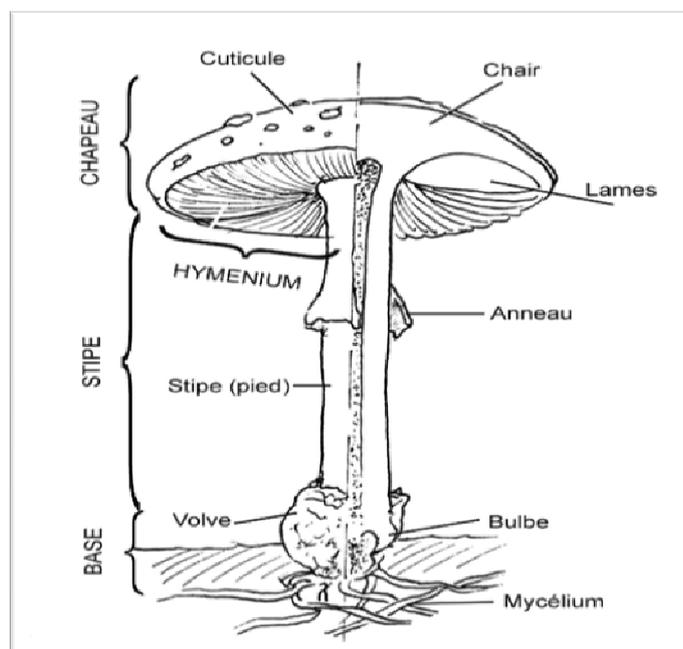


Figure 5 : schéma représentatif d'un carpophore.

L'étude de la diversité phénotypique des ectomycorhizes repose sur la description des caractères morphologiques (couleur, aspect : dichotome, simple ou ramifiée, turgescence, poilues... ; présence/absence de mycélium au contact).

b- Diversité moléculaire des ectomycorhizes

La variabilité génétique doit être quantifiée et décrite par un nombre réduit de paramètres et ceci pour une meilleure exploitation en sélection. Elle peut être estimée à partir de données phénotypiques ou moléculaires. L'apport de la génétique Mendélienne classique à l'évaluation de la variabilité génétique est malheureusement entravé par la lenteur de l'expression des génotypes, et par l'influence de l'environnement sur ces derniers. Les biotechnologies fournissent des outils performants par l'étude directe du génotype à travers l'ADN et permettent ainsi de contourner ce handicap. Ils permettent une étude précise de la biodiversité et constituent des outils précieux pour l'application d'une gestion forestière durable.

Les analyses directes de la variation génétique au niveau de l'ADN permettent une estimation des variabilités dans les différents niveaux hiérarchiques de l'organisation des populations naturelles. Dans ce contexte, plusieurs techniques moléculaires ont été développées. Leur utilisation a été efficace dans l'étude de la variabilité génétique intra et inter-spécifique des constituants de l'écosystème forestier. Au Maroc, ils pourront aider à la sélection de génotypes les mieux adaptés aux conditions environnementales, devenues de plus en plus stressantes.

b-1- Les marqueurs moléculaires

Un marqueur moléculaire est un caractère mendélien entièrement déterminé par la nature des gènes présents à un locus. Il est polymorphe du fait que chaque locus est caractérisé par de nombreux allèles à des fréquences élevées et co-dominants car chacun des génotypes possibles se traduit par une modalité propre du caractère. Les caractères qui peuvent être utilisés comme marqueurs sont fournis par différentes sources de polymorphisme dont on peut citer :



La

PCR ou « Réaction de Polymérisation en Chaîne) (ou encore ACP : Amplification en Chaîne par Polymérase), est une méthode de biologie moléculaire d'amplification génétique cible In

in vitro, qui permet de copier en grand nombre, une séquence d'ADN ou ARN connue, à partir d'un échantillon complexe et peu abondant. Son principe et les conditions expérimentales qui en découlent sont très simples. Il est basé sur une répétition de cycle de transition de température. Chaque réaction met en œuvre deux amorces oligo-nucléotidiques dont les extrémités 3-prime pointent l'une vers l'autre. Les amorces définissent alors, en la bornant, la séquence à amplifier. Le programme de la PCR comprend trois phases majeures :

- ✓ Dénaturation initiale : cette étape permet de déshybrider les ADN double brin, de casser les structures secondaires, d'homogénéiser le milieu réactionnel par agitation thermique, d'activer les polymérases et de dénaturer d'autres enzymes qui pourraient être dans la solution.
- ✓ Amplification : cette étape se répète un certain nombre de fois et comprend trois étapes :
 - La première étape correspond à la phase de dénaturation. Elle permet de déshybrider les ADN, de décrocher les polymérases qui seraient encore liées à une matrice et d'homogénéiser le milieu réactionnel.
 - La deuxième étape correspond à la phase d'hybridation ou d'appariement des amorces. Cette étape permet aux amorces sens et anti-sens de s'hybrider aux ADN matrices grâce à une température qui leur est thermodynamiquement favorable.
 - La troisième étape correspond à la phase d'élongation ; cette étape permet aux polymérases de synthétiser le brin complémentaire de leur ADN matrice à une température qui leur est optimale. Ce brin est fabriqué à partir des dNTPs libres présents dans le milieu réactionnel.
- ✓ Polymérisation finale : correspond à l'hybridation (pariage) des doubles brins d'ADN.



La

RAPD (ou Amplification Aléatoire d'ADN Polymorphe) est une application directe de la PCR. Son principe est celui de la PCR, basé sur l'utilisation d'une seule amorce synthétique de 10 nucléotides (Williams et al., 1990) mais dans laquelle les segments d'[ADN amplifiés](#) ne sont pas choisis par l'expérimentateur, c'est-à-dire amplifiés « au hasard ».



La

RFLP ou « Polymorphisme de la Longueur des Fragments de Restriction » constitue un outil puissant pour la détection de la variabilité génétique directement mesurée au niveau de l'ADN. Cette technique se base, au niveau moléculaire, sur les mutations ponctuelles qui modifient le site de reconnaissance

de l'endonucléase de restriction. Un site de restriction peut être perdu ou gagné suite à ces mutations, ou à une modification chromosomique conduisant à une insertion, délétion, translocation ou inversion. Toutes ces situations donnent des différences en longueur des fragments de restriction détectables par les hybridations de type « Southern ADN/ADN » (Benckmann et Soller 1986). Son principe est très simple, il consiste à la digestion enzymatique que par des enzymes de restriction des produits de la PCR.

➤ La AFLP ou « Polymorphisme d'Amplification de la Longueur des Fragments » (Vos et al., 1995). Elle est basée sur une double digestion enzymatique. Cette technique permet d'évaluer tout le génome, elle consiste en une double digestion enzymatique et régénère, selon la combinaison des amorces utilisées, plusieurs fragments d'ADN. Ces fragments sont amplifiés par PCR en utilisant des amorces spécifiques complémentaires à un brin des adaptateurs.

➤ Les SSR ou « microsatellites » sont des simples séquences répétitives chez les Eucaryotes (Brayan et al., 1998). Ces microsatellites ont une séquence répétitive contenant un motif de base inférieur à 6 pb. Les microsatellites à deux nucléotides sont les plus abondants et réparties dans tout le génome. L'analyse des microsatellites est basée sur l'amplification par PCR.

b-2- Applications des techniques moléculaires à l'étude des champignons ectomycorhiziens

La collecte des ectomycorhizes est plus destructive et beaucoup plus fastidieuse que la récolte des carpophores. Par contre, elle permet de visualiser directement la composition des communautés (Visser, 1995 ; Karen et Nylund, 1996 ; Horton et Bruns, 2001). Le problème majeur de cette méthode a longtemps résidé dans l'identification des espèces fongiques impliquées dans les morphotypes ectomycorhiziens. Malgré la publication d'ouvrages de référence (Agerer, 1987-2001 ; Goodman et al., 1996-2000), beaucoup de morphotypes demeurent non identifiés. Grâce principalement à l'établissement des méthodes de biologie moléculaire (Gardes et al., 1991b ; Gardes et Bruns, 1996b ; Goodman et al., 1996-2000 ; Horton et Bruns, 2001), cette contrainte de la reconnaissance des espèces a pu être en partie résolue.

Ainsi, après un bref tri morphologique sous loupe binoculaire, l'identification moléculaire s'est avérée une méthode très efficace. L'approche couramment utilisée consiste à amplifier par PCR une région de l'ADN ribosomique (ADNr) nucléaire (Figure 6) à l'aide d'amorces nucléotidiques universelles et spécifiques (White et al.,

1990 ; Gardes et Bruns, 1993). Cette région est répétée (Srivasta et Schlessinger, 1991) de 50 à 100 fois (Cassidy *et al.*, 1984) et est donc déjà «pré-amplifiée» au sein du génome. L'ADNr nucléaire comprend des séquences codantes très conservées (5S, 18S, 28S et 5.8S) utilisables en phylogénie moléculaire (Begerow *et al.*, 1997), séparés par des espaceurs transcrits (ITS, variables d'une espèce à l'autre mais très rarement au sein d'une même espèce) (Bruns *et al.*, 1991) et des espaceurs non transcrits (IGS, peu conservés à l'échelle de l'espèce). Par la suite, une digestion est pratiquée sur la région amplifiée à l'aide d'endonucléases de restriction (PCR-RFLP). Un patron ITS-RFLP, propre à chaque espèce, est ensuite obtenu par électrophorèse sur gel d'agarose.

Une étape supplémentaire de séquençage et de comparaison de séquences avec des banques de références électroniques est généralement nécessaire afin de s'assurer de la bonne identification des champignons. Une simple comparaison avec des banques de données RFLP, réalisées préalablement sur des carpophores clairement identifiés peut également suffire (Agerer, 1987-2001 ; Gardes et Bruns, 1996b ; Dahlberg *et al.*, 1997 ; Karen *et al.*, 1997 ; Kernaghan *et al.*, 1997 ; Sakakibara *et al.*, 2002 ; Bakkali *et al.*, 2008). L'utilisation de l'ITS a donc permis la constitution de bases de données non négligeables (Bakkali *et al.* (2009). Gardes *et al.* (1991a et b) ont montré qu'il est également possible d'utiliser la petite sous-unité de l'ADNr mitochondrial pour l'identification et la phylogénie d'espèces fongiques. Cette région est polymorphe d'une espèce à l'autre, tout comme l'ADNr nucléaire et ce, en longueur et en séquence.

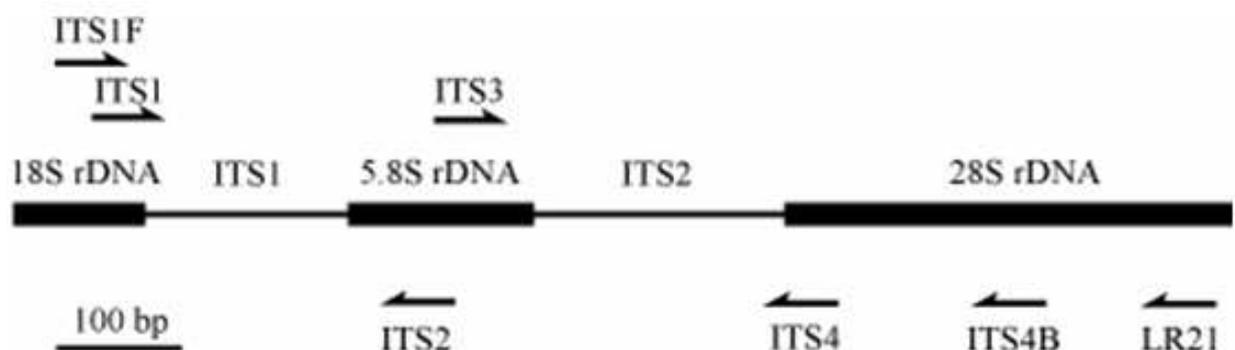


Figure 6 : Représentation schématique de la région de l'ADN ribosomique ITS (Internal Transcribed Spacer) chez les organismes eucaryotes.

Légende : Les flèches représentent les sites de fixation de certaines amorces les plus utilisées en écologie moléculaire des champignons.

IV- Les ectomycorhizes pour un développement durable

Les mycorhizes existent naturellement dans les pépinières traditionnelles. Il s'agit le plus souvent de champignons sans intérêt pour le développement ultérieur des plants. Par contre en forêt, les mycorhizes sont abondants et nécessaires à une bonne croissance des arbres, mais disparaissent très rapidement 1 à 2 ans après une coupe rase. Les mycorhizes sont également absentes dans les anciennes terres agricoles et dans les sites perturbés (routes, autoroutes, mines, carrières, friches industrielles). Dans ces conditions les plants traditionnels peuvent rencontrer d'énormes problèmes de reprise et de croissance, en revanche les plants mycorhizés avec des souches sélectionnées (Mycorhization contrôlée) expriment tous leurs avantages, en améliorant leurs performances en plantation. Cette pratique est actuellement adaptée pour le développement et une meilleure pratique sylvicole. Cette technique consiste à établir la symbiose, en pépinière, entre un jeune semis et un champignon mycorhizien d'une souche particulière. Cette souche aura été préalablement sélectionnée, par l'outil moléculaire, pour ses caractéristiques intrinsèques liées à sa capacité de coloniser efficacement les racines fines des semis et sa capacité à améliorer la croissance des plants, notamment en augmentant le potentiel d'absorption du système racinaire. Après transfert de ces plants en forêt, les souches fongiques inoculées peuvent survivre et assurer ainsi une meilleure reprise ou une meilleure croissance des arbres (Le Tacon et *al.*, 1997). Donc, un cortège mycorhizien optimal agirait comme un « engrais » sans ses inconvénients, et gratuitement, en se passant de pesticides, fongicides et amendements.

Deuxième partie

MATERIELS ET METHODES

I- Choix des sites

Notre étude a été focalisée sur l'une des subéraies les plus importantes au Maroc et du monde, il s'agit de la forêt de la Maâmora. Deux sites expérimentaux ont été définis avec des différents niveaux d'anthropisation :

- Site I (N 34° 12' 34'', W 6° 35' 57'') : un site accessible non clôturé, exposé au pâturage et à toutes les contraintes anthropiques.
- Site II (N 34° 1' 39'', W 6° 32' 49'') : un site clôturé, protégé contre les intrusions du gibier, des promeneurs....

Pour réaliser ce travail, des tournées de prospection ont été effectuées dans les 2 sites à des périodes différentes. Les premières tournées ont été effectuées en période d'été par l'équipe chargée du projet en CRF, dont j'ai bénéficié de leur résultats, et une autre tournée, à laquelle j'ai participé, vers la fin du mois de Janvier.

Au niveau de chaque site, une aire d'essai a été définie, de longueur de 30 m et de largeur de 7,5 m, dans laquelle 10 échantillons, de sol-racine de chêne-liège, distant l'une de l'autre de 7,5 m, ont été prélevés (Figure 7). Pour ceci, on élimine de la couche organique superficielle et on prélève de la partie organo-minérale sous-jacente jusqu'à une profondeur de 10 cm. Les échantillons collectés sont rapidement amenés au laboratoire et conservés à +4°C.

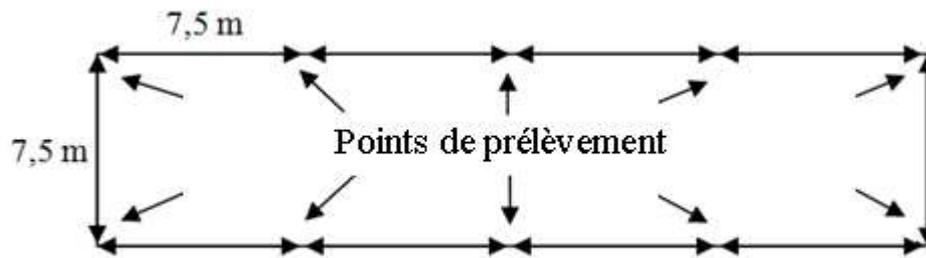


Figure 7 : Schéma explicatif de l'aire d'essai.

II- Diversité phénotypique des champignons mycorhiziens

La mise en évidence de l'existence des ectomycorhizes peut être effectuée à l'œil nu sans aucun grossissement (Marx et Bryan, 1975) tandis que la description détaillée est faite à la suite d'observation sous la loupe binoculaire et sous le microscope (Agerer, 1987-1991).

Au laboratoire, le sol-racines est versé dans une éprouvette de 1000 ml, contenant 300 ml d'eau, puis le volume final est noté. Après, le tout est versé sur deux tamis superposés, dont le diamètre de maille est différent, et on prélève cinq sous échantillons dont le poids doit être compris entre 50 et 100 g. Puis chaque sous échantillon est récupéré sur deux tamis de diamètre différent et les racines sont soigneusement lavées à l'aide d'un filet d'eau du robinet pour ne pas endommager les racines courtes, éliminer le sol, et pour les débarrasser de toutes les particules de sable, de la matière organique et les débris et permettre ainsi une meilleure observation sous la loupe binoculaire.

Après ce lavage du matériel récupéré, les ectomycorhizes sont triées dans l'eau sous la loupe binoculaire et la diversité de chaque échantillon est décrite sur des bases des caractéristiques morphologiques (Agger 1987-1998). Pour chaque sous échantillon, on compte le nombre de différents types d'ectomycorhizes et le total des

apex mycorhizés et non mycorhizés. Les données relevées de chaque échantillon sont notées.

Les différents ectomycorhizes sont séparées selon l'allure générale, le mode de ramification, la texture de la surface, la couleur du manteau, la présence des rhizomorphes. Les ectomycorhizes trouvées sont ensuite décrites, photographiées, séchées et conservées dans des tubes eppendorff à -20°C, pour des identifications moléculaires ultérieures.

Remarque : Pour l'étude de l'effet de saison sur la diversité phénotypique, nous avons exploité les résultats du comptage des ectomycorhizes réalisé en période d'été au centre CRF, par l'équipe du projet, pour les comparer avec les résultats des prélèvements en printemps.

III- Diversité moléculaire des champignons ectomycorhiziens

L'analyse moléculaire des ectomycorhizes consiste à identifier chaque morphotype trouvé en utilisant les techniques moléculaires modernes. Cette caractérisation spécifique est réalisée en étudiant le polymorphisme de l'ITS (*Internal Transcribed Spacer*) de l'ADN ribosomique nucléaire par la technique PCR-RFLP (*Polymerase Chain Reaction – Restriction Fragment Length Polymorphism*) et du séquençage de l'ITS. Ceci permettra de compléter les observations phénotypiques et de mieux mettre en valeur cette diversité des champignons ectomycorhiziens.

3- Extraction d'ADN par le protocole du Kit Qiagen

Pour chaque morphotype, l'ADN total a été extrait à partir d'un apex racinaire mycorhizé en utilisant le kit Qiagen (Dneasy Plant Mini Kit). Le protocole est décrit ci-après :

Il consiste à broyer un seul apex, à l'aide de piston, avec 400 µl du tampon AP₁ et quelques milligrammes de PVP (polyvinylpyrrolidon). Puis on ajoute 4µl de l'ARNase et nous incubons les échantillons pendant 10 min à 65°C en agitant 2 à 3 fois par inversement des tubes. La solution est additionnée de 130 µl du tampon AP₂. Après incubation 5 min dans la glace, on centrifuge 5 min à 13 000 rpm à température

ambiante et on récupère le surnageant dans des mini-colonnes de filtration « QIASchredder Mini Column ». On centrifuge de nouveau pendant 2 min à 13 000 rpm. Le surnageant est transféré dans de nouveaux tubes puis additionner de 1,5 (v) du tampon AP₃. Le mélange est transféré dans des colonnes « Dneasy Mini Spin Column » (permettent la fixation d'ADN). Après centrifugation à 8000 rpm pendant 1 min nous éliminons le surnageant. Les colonnes sont transférées dans de nouveaux tubes de 2 ml et lavées par 500 µl du tampon AW. Le surnageant est éliminé après centrifugation à 8 000 rpm pendant 1 min. Un deuxième lavage est réalisé avec 500 µl de AW puis centrifugation pendant 2 min à 13 000 rpm et élimination du surnageant. Une étape de séchage supplémentaire est réalisée par centrifugation 2 min à 13 000 rpm. La membrane est transférée dans des eppendorfs de 1,5 ml et additionnée de 20µl du tampon AE (préchauffé à 65°C). Après 5 min d'incubation à température ambiante, nous centrifugeons à 8000 rpm durant 1 min. L'ADN extrait est conservé à + 4°C.

4- Amplification par PCR de l'ITS d'ADN ribosomique

Les amorces ITS₁F (amorce spécifique des champignons (Gardes et Bruns, 1993)) (5' CTT GGT CAT TTA GAG GAA GTA A 3') et ITS₄ (5' TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC 3') ont été utilisées pour amplifier, par la PCR, l'espaceur interne transcrit (ITS). Le kit utilisé pour l'amplification est le *Kit Bioline*.

La réaction d'amplification est réalisée en ajoutant 2 µl de l'extrait d'ADN à 48 µl du mélange réactionnel contenant 25,9 µl d'eau ultrapure, 5 µl du tampon d'enzyme (10x), 1,5 µl du MgCl₂ (50 mM), 5 µl des désoxyribonucléotides triphosphates dNTPs (2 mM), 5µl des amorces ITS₁F (5µM), 5µl des amorces ITS₄ (5µM) et 0,6µl de la Taq polymérase (5unités/µl). Un témoin négatif est réalisé pour déceler la présence ou l'absence d'ADN contaminant dans le mélange réactionnel. Les amplifications se sont déroulées dans un thermo-cycleur (Applied Biosystems 2720) selon le programme suivant : dénaturation initiale (5min à 94°C), suivi de 35 cycles comprenant trois phases : dénaturation (30 s 94°C), fixation des amorces (30 s à 55°C), élongation (1 min à 72°C), puis une étape de polymérisation finale (7min à 72°C). Les échantillons sont maintenus à +4°C. Le test des produits de la réaction se fait par l'électrophorèse sur gel d'agarose de 2%.

5- Purification d'ADN à partir du gel par le kit Qiagen

A partir d'un gel d'électrophorèse de tous le PCR, les bandes d'ADN-agarose sont excisées sous la table UV, puis mises dans des tubes d'ependorf. Après la pesée des bandes, on y ajoute 3 volumes du tampon QG pour 1 volume de gel (soit 100 mg de gel équivalent à 100 µl de gel). Les tubes sont incubés, par la suite au bain-marie à 50°C pendant 10 minutes jusqu'à la dissolution complète du gel et on vortexe toutes les 2 à 3 minutes. Après, on ajoute 1 volume de l'isopropanol (100%) pour 1 volume du gel et on mélange bien par un mouvement de vas et viens. On transfère le mélange dans les colonnes « Qiaquick Spin Column » puis on centrifuge 1minute à 13000 rpm et on élimine le filtrat. Puis, on lave la colonne par 500 µl du tampon QG et on centrifuge à nouveau 1 minute à 13000 rpm. On élimine le filtrat et on ajoute 750 µl du tampon PE et on incube 5 min à température ambiante. On centrifuge 1 min à 13000 rpm et on élimine le surnageant puis on centrifuge à sec à nouveau. On transfère les colonnes dans des tubes d'ependorf et on ajoute au centre de la colonne 25 µl de l'eau ultra pure stérile. Après incubation 5 min à température ambiante, on centrifuge 1 min à 13000rpm et l'ADN récupéré est conservé à -20°C.

6- Polymorphisme de Longueur des Fragments de Restriction (RFLP)

Quatre enzymes ont été utilisés pour digérer la région ITS. Un aliquot de 8 µl d'amplifiât d'ADN est digéré dans un volume final de 10 µl d'un mélange réactionnel contenant 0,4 µl d'eau ultra-pure, 1µl de tampon d'enzyme 10x, 0,1µl de BSA (10mg/µl) et 0,5µl d'enzyme (10unités/µl). Le mélange est incubé une nuit à 37°C pour les enzymes *Msp I*, *EcoRI* et *Hinf I* et 2heures à 65°C pour l'enzyme *TaqI*. Le test des produits de la digestion est réalisé par électrophorèse sur gel d'agarose de 3%, permettant la séparation de fragments d'ADN de petite taille. Un marqueur de poids moléculaire (1kb ladder Promega) est mis à migrer parallèlement aux produits de la digestion pour permettre la détermination de la taille des fragments digérés.

Tableau 1: liste des enzymes de restriction utilisées et de leur site de coupure

Enzyme	Site de coupure
--------	-----------------

<i>HinfI</i>	5'...G [^] ANTC...3'
<i>EcoRI</i>	5'...G [^] AATTC...3'
<i>TaqI</i>	5'...T [^] CGA...3'
<i>MpsI</i>	5'...C [^] CGG...3'

Avec N : A ou C ou T ou G et ^ : Site de coupure des enzymes

7- Electrophorèse sur gel d'agarose

L'électrophorèse sur gel d'agarose permet d'analyser la présence et la taille des acides nucléiques contenus dans la préparation. Ceux-ci sont révélés sous UV par le bromure d'éthidium (BET) (1µg/ml), un colorant dont la fluorescence augmente très sensiblement quand il interagit avec l'ADN. Le déplacement de l'ADN est proportionnel à la taille des fragments. Les plus petits fragments migrent plus rapidement que les fragments de taille plus grande.

a- Préparation du gel

Sa préparation se fait comme suit : selon le pourcentage souhaité du gel, on pèse l'agarose auquel on ajoute le TBE 1X pH=8 (TBE 10X : 0,89 M Tris-HCl, 0,89 M acide Borique, 25mM EDTA), puis le mélange est porté à ébullition jusqu'à dissolution complète d'agarose et laissé refroidir jusqu'à ce qu'il soit possible de le saisir par la main nue (environ 60°C). Après, le gel est coulé doucement dans la plaque de migration, où on a positionné le peigne qui permettra de creuser les puits. L'épaisseur du gel est déterminée par le volume du dépôt souhaité. Une fois le gel est solidifié, le peigne est retiré et nous le mettons dans la cuve de migration, remplie de TBE 1X, en positionnant les puits du côté de la cathode car la migration se fait de la cathode vers l'anode vu que les fragments d'ADN sont chargés négativement.

b- Dépôt des échantillons

2µl du tampon de charge (bleu de bromophénol 25%, glycérol 50% et TE qsp 50%) sont mélangés avec 8 µl d'ADN dans le cas du produit PCR et 10µl d'ADN du produit RFLP. Dans le cas de la purification d'ADN à partir du gel, 8 µl du tampon de charge sont mélangés avec tous le produit PCR, soit 50 µl. Par la suite, nous prélevons le mélange ; à l'aide d'une

micropipette réglée sur le volume approprié ; et nous le mettons dans le puits. Un puits sera réservé au marqueur de poids moléculaire : 2kb pour la PCR et 1kb pour la RFLP. Avant de lancer la migration, on vérifie que le TBE 1X couvre le gel, puis la cuve est fermée et les câbles sont branchés pour mettre la cuve sous tension : 100V jusqu'à la pénétration de l'ADN dans le gel, puis on baisse le voltage à 80V. Une fois le tampon de charge arrive à proximité du bord du gel, l'alimentation est coupée et la plaque contenant le gel est récupérée.

c- Révélation des bandes d'ADN

Pour la révélation, le gel est mis dans un bain de bromure d'éthidium (BET) (1µg/ml) pendant 12 à 20 min selon l'épaisseur du gel, puis rincé par de l'eau distillée, pour être enfin exposé aux UV. L'ADN migré apparaît sous forme de bandes fluorescentes puis photographié avec un système photoprint.

8- Analyse des données moléculaires PCR et PCR/RFLP

Pour la détermination de la taille des marqueurs obtenus (PCR ou PCR/RFLP), Il existe une relation inverse entre la distance parcourue par le fragment d'ADN et le log décimale de son poids moléculaire. Pour les gels PCR/RFLP des ectomycorhizes associées au chêne-liège, les bandes polymorphes de chaque profil sont désignées par leur présence (1) ou absence (0).

Les matrices ainsi établies pour les différents marqueurs générés par les différentes enzymes utilisées (*EcoR I*, *Hinf I*, *Mps I* et *Taq I*) ont été regroupés par la méthode UPGMA (méthode de la classification ascendante hiérarchique non pondéré) et l'indice de similitude de Jaccard aboutissant à la construction d'un dendrogramme phylogénique.

9- Quantification et qualification de l'ADN purifié pour le séquençage

Avant le séquençage des ITS, les concentrations et la pureté de l'ADN ont été déterminées par le nanodrop au Laboratoire International Mixte au sein de la Faculté des Science de Rabat.

La quantification et la qualité de l'ADN sont estimées par la mesure de la densité optique à 260 nm, 280 nm et 230 nm. La contamination par les ARNs et les

protéines est évaluée respectivement par les rapports DO_{260}/DO_{230} et DO_{260}/DO_{280} . Le rapport DO_{260}/DO_{280} renseigne sur la contamination d'ADN par les protéines. Pour une bonne qualité d'ADN ce rapport doit être compris entre 1,8 et 2. Par ailleurs, la qualité et la quantité d'ADN peuvent être estimées en faisant comigrer sur le même gel avec une gamme de solutions d'ADN de concentrations connues. Cela permet aussi de voir si l'ADN est dégradé ou pas (présence de smears).

10-

Séq

uencage d'ADN

Le séquençage des espaceurs intergéniques transcrits (ITS), souvent amplifiés conjointement avec le 5,8S qui les sépare, a été effectué au sein du Centre National de la Recherche Scientifique et Technique (CNRST) de Rabat, dans la division UATRS : Unités d'Appui Technique à la Recherche Scientifique.

Les séquences obtenues sont ensuite comparées aux séquences déposées dans les banques de données internationales en utilisant la procédure BLAST du site Internet NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). L'analyse phylogénétique a utilisé la méthode du maximum de vraisemblance mise en œuvre dans le programme PhyML sur le site (<http://www.phylogeny.fr/>).

IV- Analyse statistique

Nous avons évalué les données des différents sites à l'aide des indices de diversité (Richesse spécifique et l'indice de Shannon).

Pour évaluer l'impact des différents facteurs (état du site, saison de prélèvement), on a eu recours à l'analyse multi-variée, par la méthode d'ordination Capscale.

Toutes des analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel R.

Troisième partie

RESULTATS ET DISCUSSIONS

I- Diversité phénotypique des champignons ectomycorhiziens

L'analyse des différents échantillons a révélé 11 morphotypes d'ectomycorhizes dont certains sont représentés dans les photos de la Figure 8.

Les onze morphotypes sont décrits comme suit :

- **Morphotype 1** : ectomycorhizes souvent ramifiées, de couleur marron claire et possédant un mycélium de la même couleur.
- **Morphotype 2** : ectomycorhizes simples, hirsutes de couleur noire, avec des hyphes raides noires radiantes. Ce type est formé par *Cenococcum geophilum*.
- **Morphotype 3** : ectomycorhizes souvent ramifiées, de couleur marron sombre et possédant un mycélium de la même couleur.
- **Morphotype 4** : ectomycorhizes de couleur claire « hyaline » avec un mycélium d'aspect cotonneux et possédant une ramification pyramidale.
- **Morphotype 5** : ectomycorhizes de couleur marron, simple ou ramifiées, possédant un mycélium argenté et des cordons blancs allongés et ramifié.
- **Morphotypes 6** : ectomycorhizes marron sombre, souvent ramifiées, pourvues d'une longue chevelure rougeâtre.
- **Morphotypes 7** : ectomycorhizes simple, de couleur claire avec un reflet argenté.
- **Morphotype 8** : ectomycorhizes de couleur noire, simples, allongées et possèdent une faible chevelure noire.
- **Morphotype 9** : ectomycorhizes jaune translucide, lisse, simples ou possèdent une ramification pyramidale.
- **Morphotype 10** : ectomycorhizes de couleur noire, allongées de ramification irrégulière pyramidale et possèdent un mycélium cotonneux.
- **Morphotypes 11** : ectomycorhizes de couleur marron foncé avec des extrémités claires « blanchâtre » et possédant un mycélium blanc à la base des racines.



Photo 1 : MT 1



Photo 2 : MT 2



Photo 3 : MT 3



Photo 4 : MT 4



Photo 5 : MT 5

Figure 8a : Photos des différents morphotypes d'ectomycorhizes associées au chêne-liège.



Photo 6 : MT 4



Photo 7 : MT 6



Photo 8 : MT 2 et MT 8 sur la même racine



Photo 9 : MT 2 et MT 9 sur la même racine

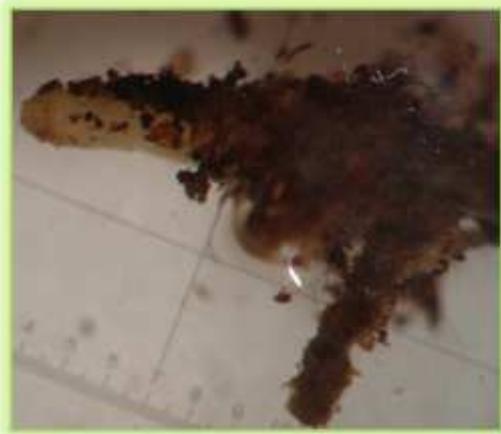


Photo 10 : MT 7



Photo 11 : MT 9

Figure 8b : Photos des différents morphotypes d'ectomycorhizes associées au chêne-liège.

Lors des tournées de prospection, on a retrouvé des fructifications de certains champignons, dont certains sont facilement identifiés selon leur aspect phénotypique, l'exemple de *Peziza badia*, *Amanita gemmata*, *Scleroderma citrinum*, *Laccaria laccata* (figure 9).



Photo BAKKALI

Laccaria laccata



Photo BAKKALI

Scleroderma citrinum



Amanita gemmata



Peziza badia



Lactarius cistophilus

Figure

9 : Photos de

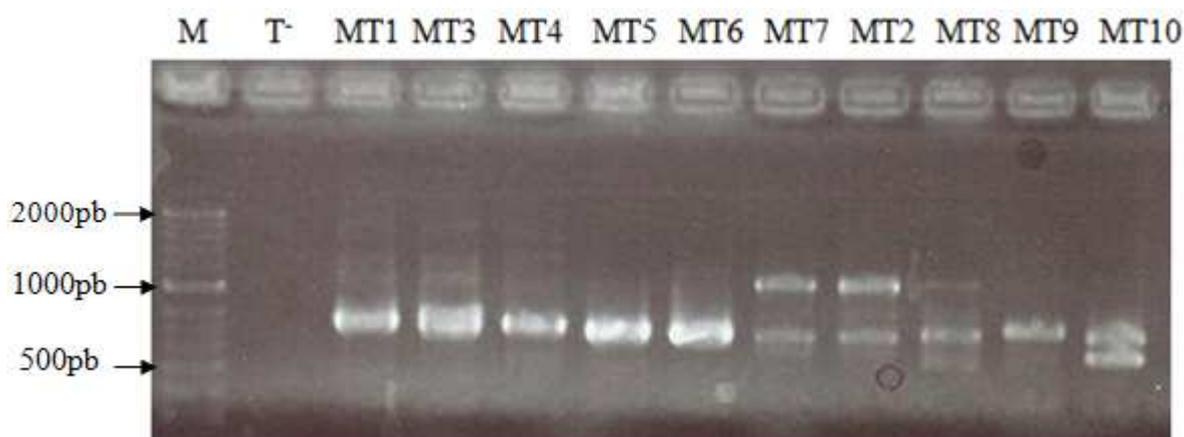
carpophores trouvées sous chêne-liège.

II- Diversité moléculaire des champignons ectomycorhiziens

L'outil de la biologie moléculaire permet de compléter les observations phénotypiques et de mieux mettre en valeur cette diversité des champignons ectomycorhiziens. Une caractérisation moléculaire par PCR-RFLP et un séquençage de l'ADN ribosomique a été adoptée pour les morphotypes détectés en période du printemps.

1- Amplification de l'ITS

Pour chaque morphotype, l'amplification de l'ITS a été réalisée sur l'ADN



ribosomique extrait à partir d'un seul apex. L'analyse du profil électrophorétique du produit d'amplification de l'ITS des différents morphotypes a montré la présence d'une bande de poids moléculaire situé entre 500 et 1400 pb pour tous les échantillons analysés (figure 10).

Figure 10: Electrophorèse de l'ITS des 10 morphotypes d'ectomycorhizes de chêne-liège (M : marqueur de poids moléculaire (2 kb), T : témoin négatif).

Cependant, certains échantillons, présumés un seul morphotype, ont montré plus d'une bande d'ITS. Il s'agit de différents individus d'ectomycorhizes. Ceci est dû à la succession et la superposition de plusieurs espèces, les unes sur les autres, sur le même apex racinaire.

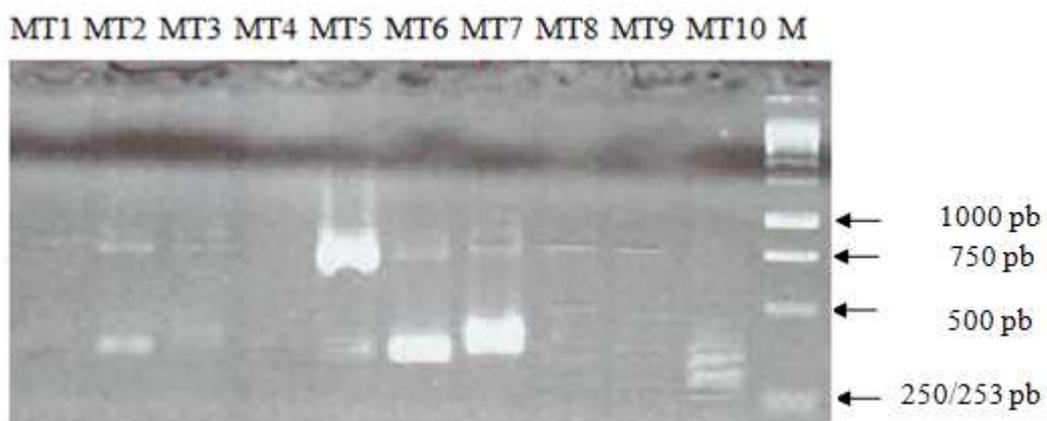
La comparaison du profil électrophorétique des ITS des différents morphotypes, montre que certains échantillons possèdent la même taille de l'ITS alors que d'autres possèdent des tailles différents de l'ITS. Donc, la taille de l'ITS ne permet pas la discrimination de différents morphotypes trouvés. C'est pour cette raison qu'on a eu recours à l'analyse RFLP.

Pour remédier le problème de plusieurs bandes d'ADN pour le même morphotype et pour une meilleure discrimination de la diversité des ectomycorhizes du par le séquençage, une purification d'ADN a été essentielle par une extraction à partir du gel d'électrophorèse du produit PCR.

2- Analyse des résultats RFLP

L'analyse et la comparaison des profils de restriction, de chaque morphotype,

i



des quatre enzymes testées (*HinfI*, *EcoRI*, *MpsI* et *TaqI*) montre une différence claire entre les différents ectomycorhizes (figure 11).

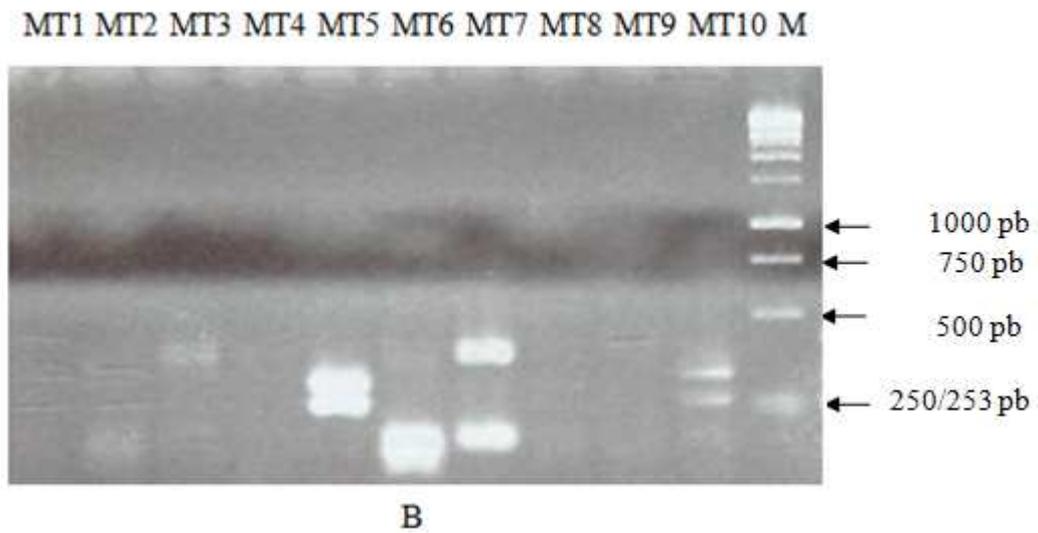


Figure 11a : Electrophorèse de l'ITS des 10 morphotypes digérés par les enzymes *EcoRI* (A) et *HinfI* (B). M : marqueur de poids moléculaire (1 kb)).

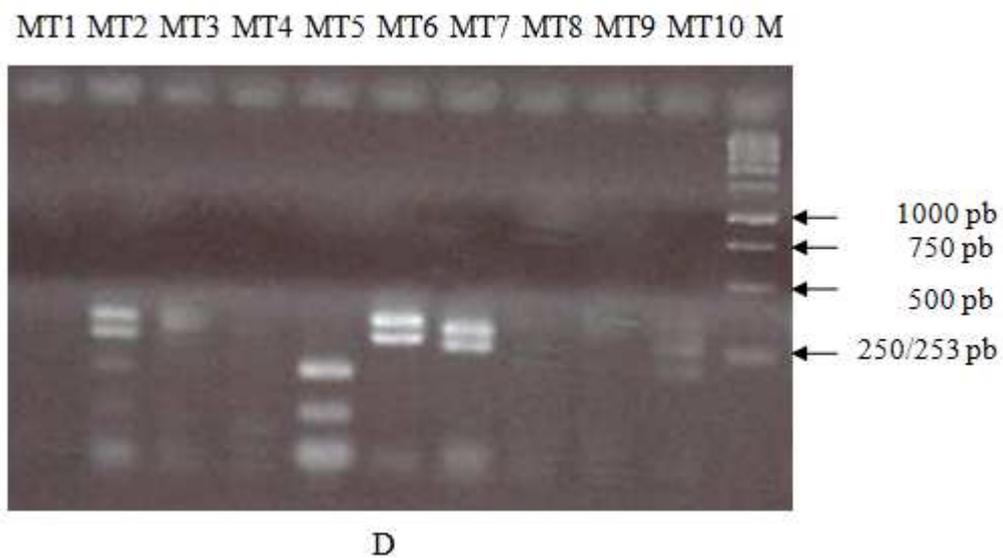
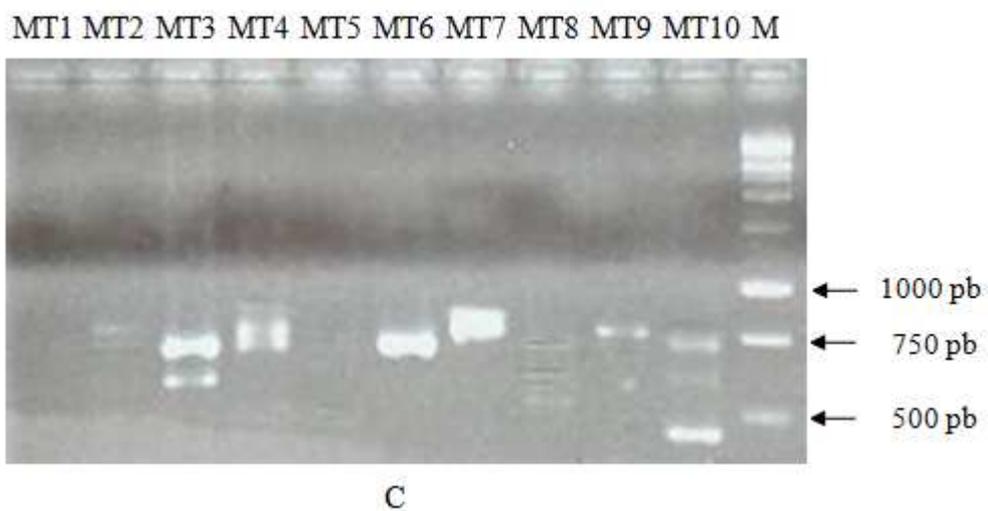


Figure 11b : Electrophorèse de l'ITS des 10 morphotypes digérés par les enzymes *MpsI* (C) et *TaqI* (D). M : marqueur de poids moléculaire (1 kb)).

La taille des ITS et des fragments de restriction des différents MT est présentée dans le tableau 2.

Tableau 2 : Taille de l'ITS et de son produit de digestion des champignons étudiés, obtenue avec les enzymes de restriction *EcoRI*, *TaqI*, *HinfI* et *MspI*.

Morphotype	Taille des bandes ITS (bp)				
	ITS	<i>EcoRI</i>	<i>TaqI</i>	<i>HinfI</i>	<i>MspI</i>
1	860	930, 810, 350	290, 190, 60	420, 305, 240	790, 700
2	800	870, 375	325, 235, 170, 105, 60	330, 290, 240, 175, 155	660, 550
3	860	930, 405	260, 215	370, 305, 175	945, 790, 700
4	860	375	260, 85, 60	-	740, 485
5	800	810, 350	170, 105, 60	270, 225, 85	-
6	800	810, 350	325, 235,	175, 135	660

7	60				
	925	930,	290, 235	350, 165	835, 740
8		430,			
		375			
	1420,	930,	925, 325,	-	700,
	925	570,	260,		580,
9		375,	215,		515,
		305	60		455
	925	930,	360, 325,	395	790, 660
		530,	60		
10		375,			
		325,	235, 105,	290, 240	790,
	860, 745		60		700,
		285			380,
				100	

3- Distance génétique et arbre phylogénique

a- Distances génétiques

L'analyse de l'ITS de l'ADN ribosomique des ectomycorhizes du chêne-liège par la méthode RFLP, a permis une étude quantitative des distances génétiques directement au niveau des séquences d'ADN. Ce qui offre l'avantage de lire directement les divergences entre segments d'ADN. La représentation de telles divergences moléculaires sous forme d'arbre est très explicite dans la mesure où elle favorise une visualisation plus significative de la structuration des séquences d'ADN. Les matrices de présence (1) – absence (0) des fragments (marqueurs) générés par des combinaisons des enzymes *EcoRI*, *TaqI* et la taille de l'ITS, chez les différents morphotypes trouvés, ont été établies (figure 12).

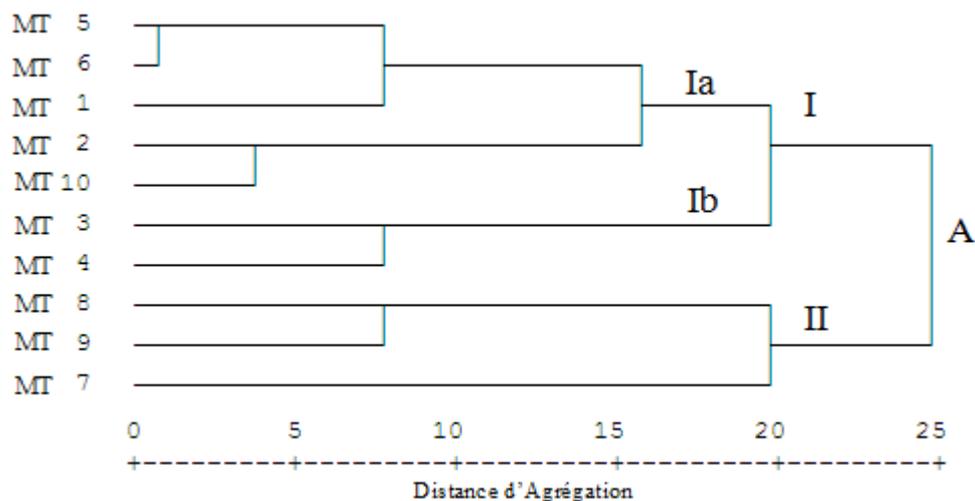


Figure 12 : Dendrogramme (UPGMA) des relations génétiques entre les ITS de l'ADNr digéré par *EcoRI* et *TaqI* des différents morphotypes identifiés par la méthode PCR/RFLP.

b- Relations génétiques entre les ITS de l'ADNr amplifiés des différents morphotypes

Les relations génétiques entre les séquences d'ITS ont été calculées à partir des données des fragments de restriction visualisés avec les deux enzymes *EcoRI* et *TaqI*. Comme les distances génétiques ne peuvent pas être estimées à partir d'un mélange indéfini de différentes molécules d'ITS (Nei, 1987), les profils complexes ont été assimilés à des profils simples en négligeant les bandes additionnelles, en agissant de même avec les profils des deux enzymes.

Le dendrogramme basé sur le regroupement par la méthode UPGMA est montré dans la figure 15. A un niveau d'agrégation de 0,25, les 10 morphotypes sont répartis en un groupe majeur (A). Au-delà de ce niveau d'agrégation, le groupe majeur (A) se subdivise à un niveau d'agrégation de 0,19 en deux sous groupes majeurs (groupes I et II). Le groupe I rassemble les morphotypes 5, 6, 1, 2, 10, 3 et 4, le groupe II rassemble les morphotypes 8, 9 et 7.

Le groupe I apparaît plus hétérogène que le groupe II. Il peut être divisé en deux sous groupes : le groupe Ia, très hétérogène, comprend les morphotypes 5, 6, 1, 2 et 10, alors que le groupe Ib contient seulement deux morphotypes 3 et 4. Remarquant

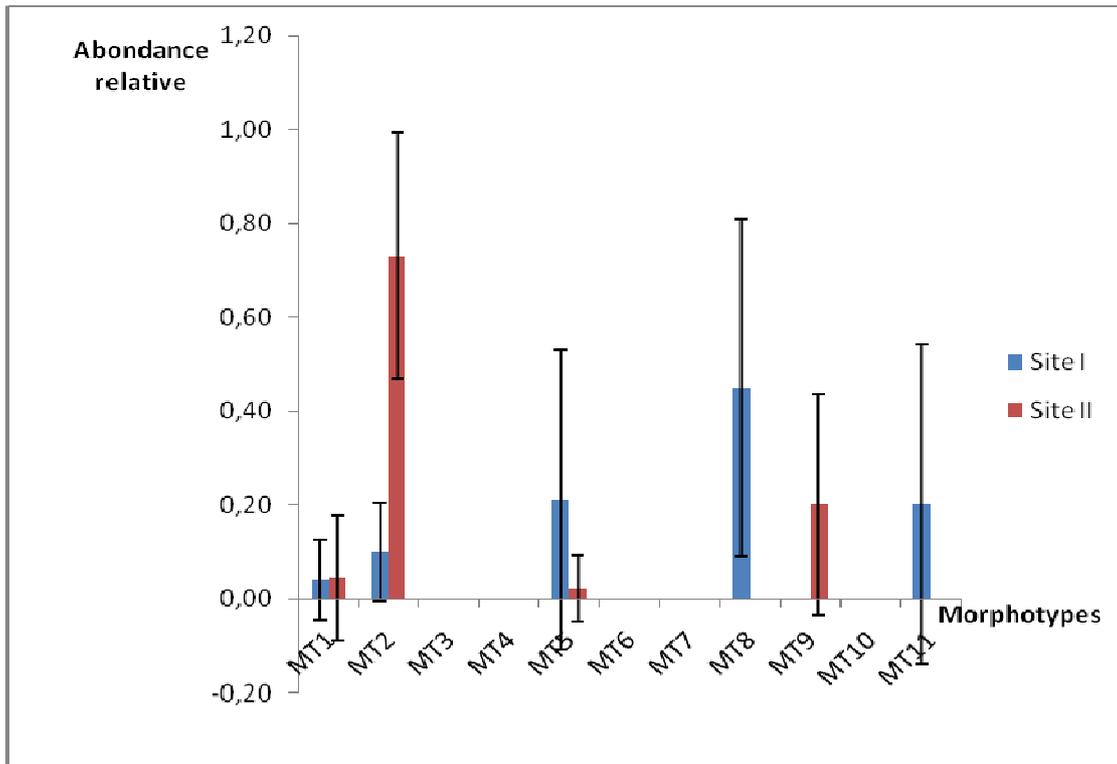
aussi qu'à 0 % d'agrégation, les dix morphotypes sont considérés comme des espèces différentes.

Sur la base des caractéristiques morphologiques des ectomycorhizes, l'identification de certaines espèces fongiques a été possible. L'application récente du concept phylogénétique de l'espèce, qui décrit l'espèce comme un groupe monophylétique au sein duquel le taux d'homologie entre séquences est élevé, a été favorisée par les progrès des techniques d'analyses moléculaires, et tend à être massivement employée en mycologie (Mischler & Brandon 1987). Ainsi, le développement des techniques moléculaires en particulier l'analyse de la diversité de l'opéron ribosomique par PCR/RFLP, permet une caractérisation suffisante pour reconnaître avec certitude une espèce fongique (Henrion *et al.*, 1992 ; Taylor *et al.*, 2000). Bakkali *et al.*, (2009a) ont rapporté une variabilité interspécifique au sein des champignons ectomycorhiziens récoltés dans les subéraies au Maroc. L'analyse PCR/RFLP de l'ITS des 10 morphotypes, avec les endonucléases utilisées, a confirmé la diversité des champignons ectomycorhiziens par l'identification de 10 ITS-RFLP types.

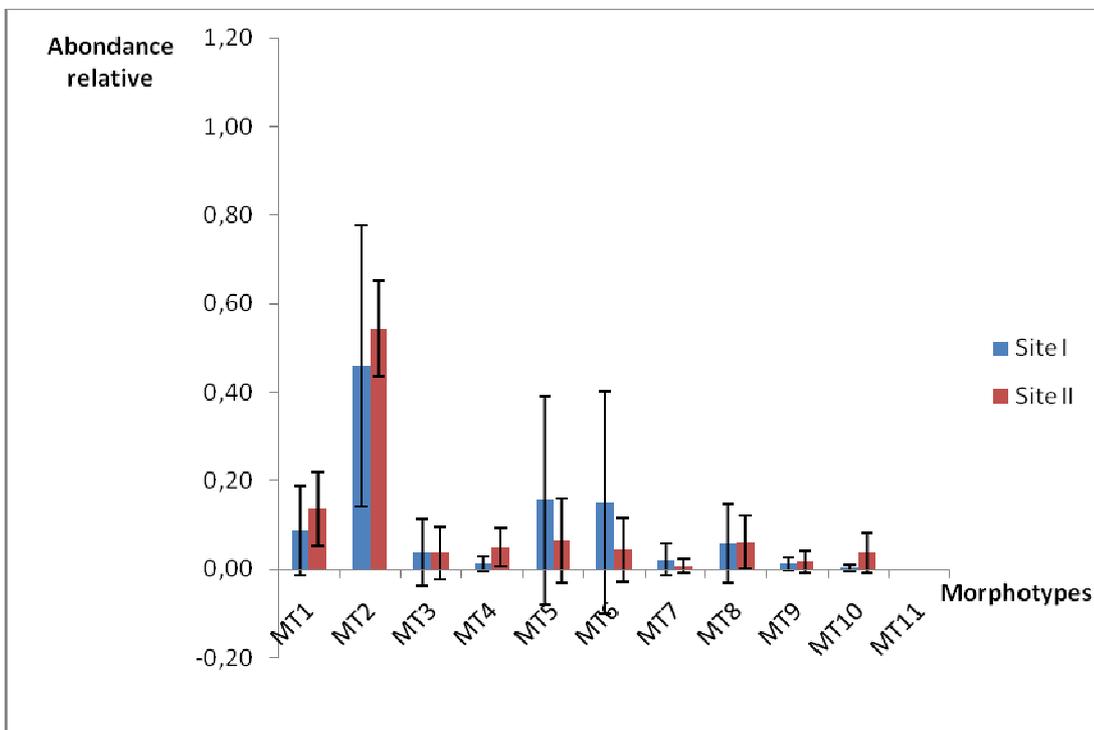
Cependant, une étape supplémentaire de séquençage des ITS des différents MT et de comparaison de séquences avec des banques de références électroniques a été nécessaire afin de s'assurer de la bonne identification de ces champignons.

4- Analyse statistique de la diversité

La figure 13 donne la diversité et l'abondance relative des différents morphotypes d'ectomycorhizes associées au chêne-liège dans les deux sites expérimentaux pendant l'été et le printemps. Pour évaluer l'effet des différents facteurs (état du site, saison de prélèvement) sur la diversité spatio-temporelle des ECM identifiés, on a eu recours à l'analyse multi-variée par la méthode d'ordination Capscale à l'aide du logiciel R (figure 14).



A



B

Figure 13 : Représentation graphique de l'abondance relative des différents types d'ectomycorhizes associées au chêne-liège dans les deux sites en période d'été (A) et en printemps (B).

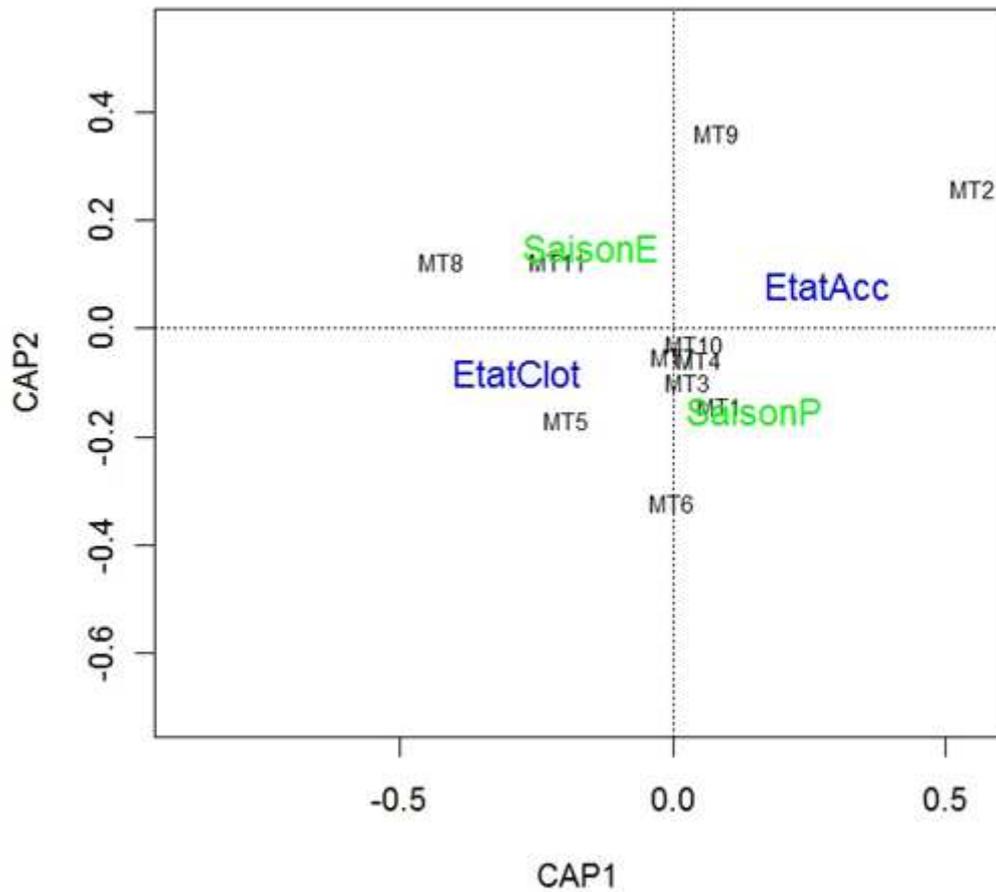


Figure 14 : Présentation de la diversité des ectomycorhizes analysée par le logiciel R.

Les premières observations concernant la diversité des ectomycorhizes identifiés sur les racines du chêne-liège, montre qu'elle est plus élevée au cours du printemps (R=10) qu'à la période d'été (R=6). Lors du passage de l'été au printemps, certains morphotypes apparaissent, cas des morphotypes 3, 4, 6 et 7, alors que d'autres disparaissent le cas du morphotype 11. Cela pourrait être dû à des exigences spécifiques, à chaque morphotype, à savoir la température et l'humidité. Les morphotypes 3, 4, 6 et 7 exigent des conditions de température et d'humidité plus douces. Le morphotype 11, au contraire, s'adapte mieux aux conditions climatiques de sécheresse. Cependant, certains morphotypes (1, 2, 5, 8 et 9), s'adaptent aussi bien aux conditions favorables de température et d'humidité qu'aux conditions stressantes, mais avec des abondances relatives différentes. Le morphotype 2 qui s'apparente à

celui de *Cenococcum geophilum*, semble être proportionnellement mieux représenté aussi bien en été qu'au printemps avec une abondance relative atteignant jusqu'à $0,73 \pm 0,23$.

Par ailleurs, cette diversité varie aussi entre les deux sites expérimentaux, en fonction de leur état (clôturé ou accessible). En effet, dans les deux sites d'étude, le nombre de MT est plus élevé dans la situation accessible (11 morphotypes) que dans la situation clôturé (10 morphotypes). On constate aussi que l'abondance relative des différents morphotypes varie d'un site à l'autre selon qu'il est clôturé ou accessible. Par exemple, le morphotype 2 est légèrement plus abondant dans la situation du site clôturé que dans le cas du site accessible, alors qu'au contraire, les morphotypes 5 et 6 sont plus abondants dans le site accessible.

L'analyse de la figure 14 nous montre que les deux variables étudiées se trouvent à des endroits opposées et confirme qu'il y a un effet significatif ($P=0,005$) de ces 2 facteurs sur la distribution spatio-temporelle des EMC identifiés. Pour l'effet de la saison de prélèvement, en été la diversité des ectomycorhizes décroît. Pour l'effet de l'état du site, les différents morphotypes sont mieux distribués en état clôturé, qu'en milieu accessible. Ceci peut être expliqué par le fait que le potentiel hydrique décroît plus vite dans ce type de traitement et que, rapporté à un même volume du sol, la biomasse racinaire y est plus faible que dans le cas clôturé. Le morphotype 2, 8 et 11 s'adaptent mieux aux conditions stressantes en période d'été et en état de milieu accessible. Ceci suggère que ces morphotypes sont plus tolérants à la sécheresse du sol que ceux formées par d'autres champignons, et/ou que leur formation est favorisée par un potentiel hydrique bas. Pour d'autres, au contraire, l'exemple du morphotype 4, 6 et 10, leur formation n'est favorisée que par un haut potentiel hydrique.

Tableau 3 : indices de la diversité calculés par la méthode ANOVA.

Indice de diversité	Saison		Etat	
	Eté	Printemps	Accessible	Clôturé
Richesse spécifique	n=6	n=10	n=10	n=11

Shannon	n=1,55	n=1,66	n=1,34	n=1,81
----------------	--------	--------	--------	--------

5- Analyse par séquençage

Les séquences des ITS obtenues ont été comparées avec les séquences nucléiques des banques de données. Ceci a permis l'affiliation phylogénétique des différents morphotypes observés (Figure 15).

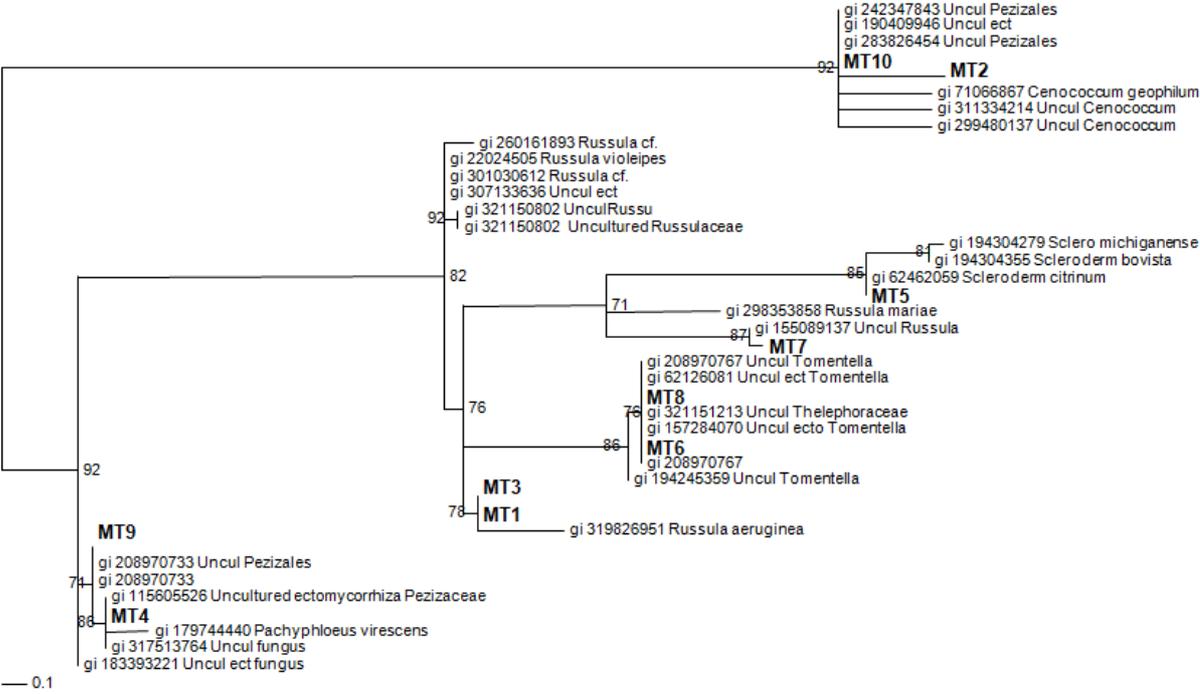


Figure 15 : Dendrogramme phylogénétique des différents morphotypes des champignons ectomycorhiziens chêne-liège.

L'analyse phylogénétique, par maximum de vraisemblance « Maximum Likelihood », a confirmé la diversité des champignons ectomycorhiziens associés au chêne-liège et a permis leurs classements au sein de 9 taxons au lieu de 10 révélés par l'analyse PCR-RFLP. Les MT1 et MT3 sont identiques. Il s'agirait de 2 ribotypes de

la même espèce du genre *Russula*. Pour le MT2, la comparaison des séquences a révélé une très grande proximité taxinomique avec *C. geophilum*. Le MT5 a montré une proximité génétique avec *Scleroderma citrinum* par une homologie de 100% et un recouvrement de 92%. Quant aux MT4, MT9 et MT10, les comparaisons de séquences indiquent une très grande proximité génétique avec des séquences de référence du genre *Peziza*. En ce qui concerne le MT6, MT7 et 8, les comparaisons des séquences avec les souches de référence ont indiqué une proximité génétique respectivement avec *Thelephora sp.*, *Russula sp.* et *Tomentella sp.*

A l'exception du MT 2 identifié jusqu'à l'espèce (*Cenococcum geophilum*), la quasi-totalité des MT ont été identifiés à l'échelle du genre.

Les différents taxons sont répartis sur deux phyla, les Ascomycètes présentés par les MT2, MT4, MT7, MT8, MT9 et MT10 et les Basidiomycètes regroupant les MT1, MT5 et MT6.

Dans cette étude, nous avons montré la dominance du *C. geophilum*. Cet ascomycète mycorhizien qui ne fructifie pas domine souvent fortement les communautés des champignons ectomycorhiziens (Richards et al., 2005 ; De Roman et De Miguel, 2005). Par ailleurs, selon Horton et Bruns (2001), il n'existe aucune étude de communauté de champignons ectomycorhiziens où ce taxon n'ait été recensé. La plupart des études sur les communautés ECM, publiées à ce jour, rapportent que cette espèce est la plus abondante avec une abondance relative allant de 11 à 29% (Abourouh et Najim, 1995 ; Al Sayegh-Petkovsek et Kraigher 2000; Dahlberg et al. 1997). Ceci peut être expliqué par sa forte concurrence et sa tolérance à la sécheresse (Molina et al 1992 ; LoBuglio 1999). Il a de ce fait une meilleure adaptation aux écosystèmes méditerranéens. En second lieu, les Thelephoraceae (*Tomentella sp.*) occupe la deuxième place avec une abondance relative atteignant jusqu'à 45 % en période d'été dans le cas du site clôturé. En Espagne, les espèces de *Thelephora* représentent 25% des MT ectomycorhiziens observés dans une forêt de *Q. ilex* (De Román et De Miguel 2002). Les Thelephoraceae dominaient également la communauté des ECM dans deux autres écosystèmes méditerranéens de la Californie (Gardes & Bruns, 1996). Les scleroderma (MT5) sont abondants aussi bien en été qu'au printemps, mais leur abondance est meilleure en conditions de site accessible. Ceci peut être expliqué par un effet bénéfique de l'action d'anthropisation qui facilite la dispersion de spores, ainsi que l'augmentation de son pourcentage de compétitivité.

Les Pezizales, représentés par les MT4, MT9 et MT10, sont au contraire, plus exigeants vis-à-vis des conditions du milieu. Ils se développent mieux en conditions favorables de température et d'humidité et leur abondance est perturbée par l'action humaine.

En comparaison avec les carpophores trouvés lors de la prospection des champignons ectomycorhiziens, on remarque l'absence d'ectomycorhizes du genre *Laccaria* et *Amanita* sur les racines de chêne-liège.

Conclusion

Les résultats de ce travail soulignent la biodiversité spatio-temporelle de la communauté des champignons ectomycorhiziens associés au chêne-liège, non seulement en termes de diversité spécifique mais aussi en termes de comportement : saisonnalité et réponse aux facteurs environnementaux. L'analyse phénotypique a révélé la présence de 11 morphotypes différents d'ectomycorhizes. L'abondance relative et la richesse des MTs sont fortement dépendantes de la saison et de l'état du site. Le MT 2 (*Cenococcum geophilum*) et le MT8 sont les plus dominants surtout en conditions stressantes et dans un état de milieu accessible exposé aux contraintes anthropiques, pâturage, etc. Cependant, le MT 7 et MT 4 forment des ectomycorhizes principalement en printemps, en conditions favorables de température et d'humidité.

L'analyse moléculaire des ectomycorhizes a permis d'identifier avec plus de précision les différents taxons. Les dix MT isolés, en période de printemps, ont fait l'objet d'une analyse moléculaire par PCR/RFLP. L'analyse des profils de restriction obtenus a confirmé la diversité génétique des CME préalablement établie par l'analyse

phénotypique. Le séquençage des ITS des différents MT a révélé la présence de seulement 9 taxons et a montré que les MT1 et MT3 représentent deux ribotypes distincts de la même espèce génétiquement proche de *Russula aeruginea*, avec un pourcentage d'homologie de 78%. Cette méthode s'avère aussi être informative et importante dans la détection des successions mycorhiziennes qui évoluent naturellement avec l'âge et les conditions sylvo-pastorales du peuplement (Durrieu, 1993).

Dans cette étude, *Cenococcum geophilum*, *Tomentalla* sp., et *Scleroderma* sp. sont les espèces qui résistent le mieux aux stress. Nous recommandons l'utilisation de ces isolats dans la mycorhization contrôlée des plants de chêne liège pour la révégétalisation des sites difficiles. Par ailleurs, l'outil moléculaire a permis de confirmer l'éventuel coexistence des deux manteaux de *C. geophilum* et *Tomentalla* sp. sur le même apex racinaire. Ceci explique la présence de double ITS pour le même apex. Les MT 6 et MT7 s'avèrent plus exigeants en potentiel hydrique et n'apparaissent qu'à des conditions favorables de température et d'humidité. Quant aux MT 4 et MT 9, ECM du genre *Peziza*, l'abondance relative est perturbée par l'anthropisation.

Globalement, en vue d'une gestion durable de nos écosystèmes forestiers, les MT identifiés pourraient être utilisés comme des bio- indicateurs de la qualité des écosystèmes forestiers.

Références bibliographiques

Abourouh M. et Najim L., 1995 ; Les différents types d'ectomycorhizes naturelles de *Cedrus atlantica* Manetti au Maroc. *Cryptogam Bot* 5: p.332–340.

Al Sayegh-Petkovsek S., Kraigher H., 2000; Types of ectomycorrhizae from Kocevška Reka. *Phyton-Annales Rei Botanicae* 40 (4): p.37–42.

Agerer R., 1987-1991; Colour atlas of ectomycorrhizae. *Einhorn-Verlag Eduard Dietenberger, Deutschland* : p. 538.

Agerer, R. (Ed)., 1987-2001; Descriptions of Ectomycorrhizae. Einhorn-Verlag Eduard Dietenberger GmbH Schwabisch Gmund, Munchen, Germany. p.183.

Bakkali Yakhlef S, Abourouh M, Morreau P-A, & Mousain D. 2008; Contribution à la constitution d'une base de données PCR/RFLP des champignons ectomycorhiziens

des subérais marocaines. 3^{ème} Congrès International de Biotechnologie. 24 au 27 mars 2008, Hammamet, Tunisie.

Bakkali Yakhlef S, Kerdouh B, Mousain D, Ducouso M, Duponnois R & Abourouh M. 2009; Diversité phylogénétique des champignons des subérais marocaines.

Beckmann, J. S. & Soller M. 1986. Restriction fragment length polymorphisms and genetic improvement of Agricultural species. *Euphytica*, 35: 111-124.

Boullard, B. 1968 ; Les Mycorrhizes. Masson et Cie, Éditeurs. Paris, p.135.

Brayan G. J., Collins A.J., Stephenson P., Orry A., 1998; J.B Smith and characterization of microsatellite from hexaploïde bread wheat. *Theor. Appl. Genet.* 94, p. 557 - 563.

Bruns T.D. & Szaro T.M. 1992; Rate and mode differences between nuclear and mitochondrial small-subunit rRNA genes in mushrooms. *Molecular Biology and Evolution* 9, p. 836-855.

Bruns T.D., White T.J. & Taylor J.W. 1991; Fungal molecular systematics. *Annual Review of Ecology and Systematic* 22: 525-564.

Cassidy J.R., Moore D., Lu B.C. & Pukkila P.J. 1984. Unusual organization and lack of recombination in the ribosomal RNA genes of *Coprinus cinereus*. *Current Genetics* 8: p.607-613.

Dalhberg A., Jonsson L., & Nylund J.E. 1997. Species diversity and distribution of biomass above and below ground among ectomycorrhizal fungi in a old-growth Norway spruce forest in south Sweden. *Canadian Journal of Botany* 75: p. 1323-1335.

De Román M. et De Miguel AM., 2002; “*Quercirhiza cumulosa*” + *Quercus ilex* L. subsp. *ballota* (Desf.) Samp. *Descr Ectomycorrhizae* 6, p. 13–18.

De Roman M. et De Miguel AM., 2005; Post-fire, seasonal and annual dynamics of the ectomycorrhizal community in a *Quercus ilex* L. Forest over a 3-year period. *Mycorrhiza* 15: p. 471-481.

- Dickie, I.A. et al. (2004).** Shared ectomycorrhizal fungi between a herbaceous perennial (*Helianthemum bicknellii*) and oak (*Quercus*) seedlings. *New Phytologist*, 164: p.375-382.
- Durieu G., 1993 ;** Ecologie des champignons. Masson, Paris, p.207.
- Egli S. & Ayer F. 1997 ;** Est-il possible d'améliorer la production de champignons comestibles en forêt ? L'exemple de la réserve mycologique de La Chenéaz en Suisse. *Revue Forestière Française* **49**. p. 235-243.
- El Asri A., EL ABID A. et BENCHEKROUN F., 1996;** Production potentielle de bois de mine dans une plantation de Pin Maritime en Forêt de la Maâmora. *Ann. Rech. For. Maroc*. T 29, p. 114-125.
- Ezzahiri M., Belghazi B., Benjelloun H. et El Wahidi F., 2006 ;** Effet du dépressage du chêne vert sur la diversité au niveau du dispositif de bouakchmir au plateau central. *Ann. Rech. For. Maroc*. 2006. Tome 37, p. 63-76.
- Fogel R., 1981;** *Quantification of sporocarps produced by hypogeous fungi. In The fungal community* (1^{ere} édition par GC. Carroll & DT. Wicklow). M. Decker, New-York, p.553-567.
- Garbaye J. & Le Tacon F. 1982 ;** Influence of mineral fertilization and thinning intensity on the fruit body production of epigeous fungi in an artificial spruce stand (*Picea exelsa* Link) in North-Western France. *Acta Oecologica* **3**: p.153-160.
- Gardes M., and Bruns T.D. 1993;** ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes-Application to the identification of mycorrhizas and rusts. *Molecular Ecology* **2**:p.113-118.
- Gardes M. & Bruns T.D. 1996a;** Community structure of ectomycorrhizal fungi in a *Pinus muricata* forest: above- and below-ground views. *Canadian Journal of Botany* **74**: p.1572-1583.
- Gardes M. & Bruns T.D. 1996b;** ITS-RFLP matching for identification of fungi. *Species Diagnostics Protocols* **50**: p.177-186.

Gardes M., Mueller J.M., Fortin J.A. & Kropp B.R. 1991a; Mitochondrial DNA polymorphisms in *Laccaria bicolor*, *L. laccata*, *L. proxima* and *L. amethystina*. *Mycological Research* **95**: p.206-216.

Gardes M., White T.J., Fortin J.A., Bruns T.D. & Taylor J.W. 1991b; Identification of indigenous and introduced symbiotic fungi in ectomycorrhizae by amplification of nuclear and mitochondrial ribosomal DNA. *Canadian Journal of Botany* **69**: p.180-190.

Gehring C.A., Theimer T.C., Whitham T.G. & Keim P. 1998; Ectomycorrhizal fungal community structure of pinyon pines growing in two environmental extremes. *Ecology* **79**: p.1562-1572.

Goodman D.M., Durall D.M., Trofymow J.A., & Berch S.M. (Editors), 1996; A manual of concise descriptions of North American ectomycorrhizae: including microscopic and molecular characterization. Mycologue publications, Sidney, B.C.

Hammoudi, A. 2002; La subéraie: biodiversité et paysage. Ministère chargé des eaux & Forêts. Vivexpo 2002, Vives 30 mai – 2 juin 2002. 5 p.

Henrion B., Di Battista C., Bouchard D., Vairelles D., Thompson B.D., Le Tacon F. & Martin F. 1994. Monitoring the persistence of *Laccaria bicolor* as an ectomycorrhizal symbiont of nursery-grown *Douglas-fir* by PCR of the rDNA intergenic spacer. *Molecular Ecology* **3**: p.571-580.

Henrion B, Le Tacon F, Martin F. 1992 ; Rapid identification of genetic variation of ecto-mycorrhizal fungi by amplification of ribosomal RNA genes. *New Phytologist* **122**: p.289–298.

Horton T.R. & Bruns T.D. 2001; The molecular revolution in ectomycorrhizal ecology: peeking into the black-box. *Molecular Ecology* **10**: p.1855-1871.

Jansen A.E. & DeNie H.W. 1988; Relations between mycorrhizas and fruitbodies of mycorrhizal fungi in Douglas fir plantations in the Netherlands. *Acta Botanica Neerlandica* **37**: p.243-249.

Kalamees K. & Silvers S. 1988; Fungal productivity of pine heaths in North-West Estonia.

Acta Botanica Fennica **136**: p.95-98

Karen O. & Nylund J.E. 1996; Effects of N-free fertilization on ectomycorrhiza community structure in Norway spruce stands in Southern Sweden. *Plant and soil* **181**: p.295-305.

Karen O., Högberg N., Dahlberg A., Jonsson L. & Nylund J.E. 1997; Inter- and intra-specific variation in the IST region of rDNA of ectomycorrhizal fungi in Fennoscandia as detected by endonuclease analysis. *New Phytologist* **136**: p.313-325.

Kendrick, B. 1992.; Mycorrhizae: **mutualistic** plant-fungus symbioses. Dans : The Focus Information Group, **Inc.** Newburyport, MA. p. 262-286.

Kernaghan G. Currah, R.S. & Bayer, R.J. 1997; Russulaceous ectomycorrhizae of *Abies lasiocarpa* and *Picea engelmannii*. *Canadian Journal of Botany* **75**: p.1843-1850.

Le Tacon F., Mousain D., Garbaye J., Bouchard D., Churin J.-L., Argillier C., Amirault J.-M. & Généré B. 1997 ; Mycorhizes, pépinières et plantations forestières en France. *Revue Forestière Française* **49**: p.131-154.

LoBuglio K.F. 1999; *Cenococcum*. In: Cairney JWG, Chambers SM (eds) Ectomycorrhizal fungi. Key genera in profile. Springer, Berlin Heidelberg, New York p. 287–310.

Mehmann B., Egli S., Braus G.H. & Brunner I. 1995; Coincidence between molecularly or morphologically classified ectomycorrhizal morphotypes and fruitbodies in a spruce forest. In Biotechnology of ectomycorrhizae. Molecular Approaches. V. Stocchi, P. Bonfante & M. Nuti (Ed). Plenum Press, New-york, p. 41-52.

Mehus H. 1986; Fruit body production of macrofungi in some North Norwegian forest types. *Nordic Journal of Botany* **6**: p.679-701.

Molina, R., Massicotte, H., and Trappe, J.M. 1992; Specificity phenomena in mycorrhizal symbioses: community-ecological consequences and practical implications. In Mycorrhizal functioning, an integrative plant fungal process. *Edited by* M.F. Allen. Chapman & Hall, New York. pp. 357–423.

Nei, M., 1987; Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics*, 89 : p.583-590.

Peter M., Ayer F. & Egli S. 2001; Nitrogen addition in a Norway spruce stand altered macromycete sporocarp production and below-ground ectomycorrhizal species composition. *New Phytologist* **149**: p.311-325.

R Development Core Team (2009) R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, <http://www.R-project>

Richard F, Millot S., Selosse M-A, Gardes M. 2005; Diversity and specificity of ectomycorrhizal fungi retrieved from an old-growth Mediterranean forest dominated by *Quercus ilex*. *New Phytologist* 166: p.1011-1023.

Sbay H., Zitani L. et Ouassou A. 1994-1995 ; Analyse des caractères morphologiques pour l'évaluation de la variabilité génétique du Chêne-liège (*Quercus suber L.*). Rapport annuel de la Recherche Forestière, 1994-1995 : p. 44-51.

Seen-Irlet B., Heilmann-Clausen J., Genney D & Dalhberg A., 2007; Guidance for Conservation of Marcofungi in Europe. Rapport The Directorate of Culture and Cultural and Natural Heritage, European Council for Conservation of Fungi, Strasbourg, p.39

Smith S.E. & Read D.J. 1997; Mycorrhizal symbiosis (2^e édition). Academic Press, New York, 605 p.

Scrivastava A.K. & Schlessinger D. 1991; Structure and organization of ribosomal DNA. *Biochimie* 73: p. 631-638.

Taylor J.W., Jacobson D.J., Kroken S., Kasuga T., Geiser D.M., Hibbet D.S., Fisher M.C. 2000; Phylogenetic species recognition and species concept in fungi. *Fungal Genetics and Biology*. 31: p.21-32.

Visser S. 1995; Ectomycorrhizal fungal succession in jack pine stands following wildfire. *New Phytologist* **129**: p.389-401.

Vogt K.A., Bloomfield J., Ammirati J.F. & Ammirati S.R. 1992; Sporocarp production by basidiomycetes with emphasis on forest ecosystems. In *The fungal community* (2^e édition par GC. Caroll & DT. Wicklow). M. Decker, New-York, p. 563-579.

Vos, P. et al. 1995; AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nuc. Acids Res.* 23: p.4407-4414.

Wästerlund I. & Ingelög T. 1981; Fruit body production of larger fungi in some young Swedish forests with special reference to logging waste. *Forest Ecology and Management* 3: p.269-294.

White T.J., Bruns T.D., Lee S., & Taylor J. 1990; *Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics.* In *PCR protocols: a guide to methods and applications.* Ed. MA Innis, DH Gelfand, JJ Snisky and TJ White. Academic Press, Inc., New-York. p. 315-322.

Williams, J.K, et al. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic marks. *Nucleic Ac. Res.* 18: 6531-653.

Glossaire

- ❖ **Carpophore** : Organe de reproduction sexuée de certains champignons. Syn. Fructification.
- ❖ **Communauté** : Groupe de populations de différentes espèces, interconnectées ou susceptibles de l'être, à un moment ou à un autre, et coexistant dans une aire donnée. Syn. Peuplement, guild.
- ❖ **Cordon** : Agrégation d'hyphes, tous du même diamètre.
- ❖ **Cortège** : Ici, sera utilisé pour désigner l'ensemble des champignons ectomycorhiziens d'une communauté d'arbres.
- ❖ **Ecosystème** : Système formé par les relations entre les organismes vivants et le milieu où ils vivent.
- ❖ **Génotype** : Désigne, ici, l'ensemble des allèles réunis dans le noyau (nucléaire) ou dans les mitochondries (cytoplasmique).
- ❖ **Hétérotrophe** : Organisme qui est incapable de produire ses propres molécules organiques et doit donc les puiser chez les êtres autotrophes.
- ❖ **Locus** : Un locus définit l'emplacement d'un allèle ou d'un gène sur un chromosome ou la carte factorielle le représentant. Pluriel; loci.
- ❖ **Morphotype** : Groupe d'individus d'espèces différentes ou semblables, morphologiquement distincts.
- ❖ **Mycélium** : Masse de filaments filiformes (hyphes), ramifiés ou réticulés, formant la structure végétative des champignons et se distinguant de la fructification. Pluriel; mycelia.
- ❖ **Population** : Groupe de génets interféconds qui partagent un ensemble de gènes (= de même espèce biologique).
- ❖ **Subéraie** : Peuplement forestier dominé par le chêne-liège.
- ❖ **Symbiose** : Association indissoluble et durable entre deux espèces dont chacune tire bénéfice (Christian Lévêque, 2008).
- ❖ **Taxon** : Groupe d'êtres vivants ou fossiles qui ont des traits communs. Pluriel; taxons.

Abréviation

- ❖ **ADN** : Acide désoxyribonucléique

- ❖ ADNr : ADN ribosomal (Nucléaire ou mitochondrial)
- ❖ AFLP : *Amplification of Fragment Length Polymorphism* (Polymorphisme de longueur de fragments amplifiés après digestion)
- ❖ dNTP : Désoxyribonucleide triphosphate
- ❖ ECM : Ectomycorhizien
- ❖ ITS : *Internal Transcribed Spacer* (Espaceur intergénique transcrit)
- ❖ IGS : *InterGenic Spacer* (Espaceur intergénique non-transcrit)
- ❖ PCR : *Polymerase Chain Reaction* (Réaction de polymérisation en chaîne)
- ❖ RAPD : *Random Amplification of Polymorphic DNA* (Amplification de segments d'ADN polymorphe de position aléatoire)
- ❖ RFLP : *Restriction Fragment Length Polymorphism* (Polymorphisme de longueur de fragments de restriction)
- ❖ SSR : *Simple sequence repeat* (séquence simple répétée)
- ❖ °C : Degré Celsius
- ❖ % : Pourcentage
- ❖ g : Gramme
- ❖ mg : Milligramme
- ❖ ml : Millilitre
- ❖ µl : Microlitre
- ❖ M : Molaire
- ❖ mM : Millimolaire
- ❖ Pb : Paire de base (unité de longueur de l'ADN)
- ❖ UV : Ultra violet
- ❖ V : Volt
- ❖ rpm : Rotation par minute
- ❖ BSA : Bovine Serum Albumin
- ❖ ETDA : Ethyl Diamine Tétra Acétyl
- ❖ CTAB : Cethyl Trimethyl Ammonium Bromide
- ❖ TBE : Tampon Tris-Borate-EDTA
- ❖ TE : Tris-ED

