

**Influence de la composition spécifique de couverts végétaux
sur les paramètres physiques, chimiques et biologiques du
système sol-plante :
étude des champignons mycorhiziens à arbuscules**

Présenté par Isaure Lohest

Promoteurs : Pierre Bertin (UCL/ELI/ELIA)
Stephan Declerck (SST/ELI/ELIM)

Lecteurs : Xavier Draye (UCL/ELI/ELIA)
Frédéric Muratori (Regénacterre)

Mémoire de fin d'études présenté en vue de l'obtention
du diplôme de Bioingénieur : sciences agronomiques

Remerciements

La réalisation de ce mémoire a été rendue possible grâce à la contribution de plusieurs personnes auxquelles je souhaite adresser mes remerciements les plus sincères.

Tout d'abord, toute ma reconnaissance se dirige vers mes promoteurs, le Pr. Pierre Bertin et le Pr. Stephan Declerck, pour m'avoir guidée tout au long de ce travail. Merci au Pr. Pierre Bertin de m'avoir permis de réaliser cette étude collaborative sur le terrain.

Merci également à Mr. Nicolas Braibant et à Mr. Gérard Collignon de nous avoir permis de réaliser l'expérimentation sur le terrain tout au long de cette année.

Je remercie du fond du cœur Pierre-Louis Alaux pour l'aide qu'il m'a apportée depuis le tout début, pour les précieux conseils qu'il m'a donnés, pour l'aide fournie lors du travail en labo et sur la parcelle, et pour la relecture de ce travail. Je tiens également à diriger ma reconnaissance à Virginie Moreau qui a été présente tout au long de ce projet pour m'aider en labo et sur la parcelle, ainsi qu'à Céline Bivort et Stephanie Huret, pour leurs conseils et leur aide indispensable pour le travail dans le labo lors des analyses biomoléculaires.

Merci aussi à tous les membres du laboratoire ECAV qui m'ont apporté leur support. Merci à Thomas Dagbert et Pierre Van Thorre pour leur aide lors de la réalisation des prélèvements en champ. Merci à Anne Iserentant pour la réalisation du dosage du phosphore, ainsi qu'à Guillaume Lobet pour ses explications toujours claires concernant l'utilisation du logiciel R.

Je remercie également Diane Heymans, Adelise Lefèvre et Denis Allard, qui ont aussi travaillé sur les couverts végétaux et avec qui l'entente a toujours été si agréable.

Je tiens à remercier le Pr. Xavier Draye pour son aide pour le traitement des résultats ainsi que pour avoir accepté d'être un des lecteurs de mon mémoire. Merci à Mr. Frédéric Muratori pour ses conseils depuis la mise en place du projet ainsi que pour le temps qu'il va consacrer dans la lecture de ce mémoire.

Ma gratitude se dirige également envers mes parents qui ont réalisé une dernière relecture de mon travail.

Enfin, je tiens à remercier Clara pour son support tout au long de l'année.

Table des matières

Table des figures	7
Liste des tableaux	9
I État de l’art	11
1 Introduction	13
2 Les couverts végétaux	14
2.1 Définition et rôle	14
2.2 Services écosystémiques	15
2.3 Réglementation	18
2.4 Choix du couvert végétal	18
3 Les champignons mycorhiziens	21
3.1 Définition et différents types	21
3.2 Structures des champignons mycorhiziens à arbuscules (CMA)	22
3.3 Cycle de développement	24
3.4 Composition de la communauté mycorhizienne et diversité d’espèces de plantes hôtes	25
4 Interactions plantes - CMA	27
4.1 Effet des CMA sur les agroécosystèmes	27
4.2 Impact de la gestion des agroécosystèmes sur les CMA : rôle des couverts végétaux et du labour	30
4.3 Diversité de CMA versus diversité de plantes hôtes	32
5 Contexte et objectif de cette étude	34
II Matériel et méthodes	37
1 Contexte de l’étude	39
2 Plan expérimental	40
3 Analyses réalisées	43
3.1 Analyse des caractéristiques des couverts végétaux	43
3.1.1 Biomasse aérienne	43

3.1.2	Biomasse racinaire	43
3.1.3	Indice de surface verte	43
3.2	Analyse des caractéristiques du sol	44
3.2.1	Phosphore disponible	44
3.2.2	Activité biologique du sol	44
3.3	Analyse des mycorhizes	45
3.3.1	Densité de propagules actives dans le sol	45
3.3.2	Taux de colonisation racinaire par les CMA	49
3.3.3	Analyse moléculaire de la biodiversité de CMA	50
4	Méthodes d'analyse statistique	54
4.1	Moyennes et écarts-type	54
4.2	Analyse de la variance	54
4.3	Relations entre variables	56
4.4	Correction des données	56
III	Résultats	59
1	Biomasse aérienne et racinaire	61
1.1	Biomasse aérienne	61
1.2	Biomasse racinaire	63
2	Indice de surface verte	64
3	Phosphore disponible	66
4	Activité biologique du sol	67
5	Densité de propagules actives dans le sol	68
6	Taux de colonisation racinaire par les CMA	71
7	Analyse moléculaire de la biodiversité de CMA	76
IV	Discussion	79
1	Interprétation des résultats	81
1.1	Couverts végétaux	81
1.2	CMA	82
1.2.1	Densité de propagules actives dans le sol	82
1.2.2	Taux de colonisation racinaire par les CMA	84
1.2.3	Biodiversité de CMA	86
1.3	Bilan des différents couverts végétaux	88
2	Conclusions et perspectives	90
	Bibliographie	95

Table des figures

I.1	<i>Représentation schématique d'une section longitudinale de racine montrant les six types de rhizodéposition [49].</i>	17
I.2	<i>Arbuscules (type Arum) et hyphes à l'intérieur d'une racine de maïs.</i>	23
I.3	<i>Représentation schématique d'un arbuscule dans une cellule racinaire.</i>	23
I.4	<i>Étapes du développement d'un CMA.</i>	25
I.5	<i>Rôle des CMA dans la diminution de la perte de nutriments par lessivage.</i>	28
II.1	<i>Localisation de la parcelle expérimentale.</i>	40
II.2	<i>Plan expérimental.</i>	41
II.3	<i>Échantillonnement MPN au temps 0.</i>	47
II.4	<i>Essai MPN : plaque de culture de 33 puits dans un bac.</i>	49
II.5	<i>Méthode d'évaluation de la colonisation racinaire par des CMA selon le méthode de McGonigle et al. (1990) [14].</i>	50
II.6	<i>Lame pour l'observation au microscope d'un échantillon selon la méthode McGonigle.</i>	51
II.7	<i>Région de l'ADNr de Glomus sp. 'intraradices' (5' - 3') (5465 bp) ciblée par les amorces spécifiques aux CMA (Af, Ar, Cf, Br) [58].</i>	52
II.8	<i>Plan expérimental.</i>	57
III.1	<i>Valeurs corrigées et moyennes de la biomasse aérienne des couverts végétaux.</i>	62
III.2	<i>Régression linéaire de la biomasse aérienne en fonction du nombre d'espèces composant le couvert végétal.</i>	63
III.3	<i>Valeurs corrigées et moyennes de l'indice de surface verte des couverts végétaux.</i>	65
III.4	<i>Régression linéaire de la densité de propagules de CMA actives dans le sol en fonction du nombre d'espèces végétales du couvert au "temps 1".</i>	69
III.5	<i>Régression linéaire de la densité de propagules de CMA actives dans le sol en fonction de la biomasse aérienne.</i>	70
III.6	<i>Densité de distribution des valeurs corrigées pour les taux de colonisation racinaire par les CMA.</i>	71
III.7	<i>Valeurs corrigées et moyennes des taux de colonisation racinaire des couverts végétaux.</i>	72
III.8	<i>Régression linéaire de RC% en fonction de la biomasse aérienne.</i>	73
III.9	<i>Régression linéaire de RC% en fonction de la biomasse racinaire.</i>	74
III.10	<i>Régression linéaire du taux de colonisation racinaire en fonction du phosphore disponible dans le sol.</i>	74

III.11	<i>Régression linéaire du taux de colonisation racinaire en fonction de la densité de propagules actives de CMA dans le sol.</i>	75
--------	--	----

Liste des tableaux

II.1	<i>Plaque de culture à 33 puits utilisée dans l'analyse MPN.</i>	48
II.2	<i>Essai MPN au "temps 0" : quantités de substrat utilisées pour les différents niveaux de dilution.</i>	48
II.3	<i>Essai MPN au "temps 1" : quantités de substrat utilisées pour les différents niveaux de dilution.</i>	48
III.1	<i>Moyennes et écarts-type des valeurs corrigées de la biomasse aérienne [T MS/ha] pour tous les traitements.</i>	62
III.2	<i>Moyennes et écarts-type des valeurs corrigées de la biomasse aérienne [T MS/ha] pour chaque densité.</i>	62
III.3	<i>Moyennes et écarts-type des valeurs corrigées de la densité de biomasse racinaire [kg/m³].</i>	63
III.4	<i>Moyennes et écarts-type des valeurs corrigées de l'indice de surface verte.</i>	64
III.5	<i>Moyennes et écarts-type des valeurs corrigées des quantités de phosphore disponible dans le sol [mg P/kg sol sec].</i>	66
III.6	<i>Moyennes et écarts-type des valeurs corrigées des mesures du taux de décomposition de la matière organique k.</i>	67
III.7	<i>Moyennes et écarts-type des valeurs corrigées des mesures MPN [nombre de propagules actives/g].</i>	68
III.8	<i>Moyennes et écarts-type des mesures corrigées des taux de colonisation racinaire, en %.</i>	72
III.9	<i>Diversité d'espèces de CMA pour les différents couverts végétaux.</i>	77

Première partie

État de l'art

Chapitre 1

Introduction

La consommation croissante de l'humanité en ressources naturelles imposée aux écosystèmes a mené ces dernières décennies à un déclin dramatique des services écosystémiques¹. Ces services offerts par les écosystèmes ont souvent été considérés comme "gratuits" et inépuisables par la société. Ils ont été évalués à 33 trillions de dollars par an par des chercheurs en 1997, soit environ deux fois la valeur du produit national brut mondial [33]. Les effets bénéfiques des microorganismes du sol, et en particulier des champignons mycorhiziens à arbuscules (CMA) sur la performance des plantes et la santé du sol sont essentiels dans la gestion durable des écosystèmes agricoles. Les CMA sont un élément clé qui peuvent permettre d'intégrer les productions agricoles dans des nouvelles stratégies d'agriculture durable.

Les pratiques agricoles intensives développées depuis le début du XX^e siècle ont permis une augmentation de la productivité agricole mondiale mais ont eu des impacts néfastes sur l'environnement et sur les services écosystémiques. La mécanisation des processus et pratiques agricoles, les monocultures et l'utilisation massive d'intrants synthétiques dégradent la qualité de l'eau, des sols et de l'air, et épuisent de nombreuses ressources naturelles non renouvelables [110]. Il est donc essentiel de développer des nouvelles techniques pour la gestion durable de l'écosystème *Terre* afin de stopper la dégradation de l'environnement tout en soutenant une production agricole durable qui puisse faire face aux besoins croissants de la population [33].

Ceci implique le besoin de développer des stratégies de gestion des cultures qui optimisent la fertilité des sols, la biodiversité et la robustesse des cultures en créant des agroécosystèmes qui respectent les processus naturels et qui permettent une production agricole durable sur le long terme [3]. Dans ce contexte, les services écosystémiques rendus par les microorganismes du sol sont les plus pertinents (qualité des sols, santé des plantes, cycles du carbone, de l'azote, etc...). Le recours aux CMA en agriculture représente une alternative à haut potentiel face à l'utilisation massive d'intrants. Les couverts végétaux sont également essentiels dans la gestion de la fertilité des sols, notamment concernant les interactions qui peuvent s'établir avec ces microorganismes du sol.

1. Les services écosystémiques représentent l'ensemble des ressources et processus fournis par les écosystèmes et apportant des bénéfices à la société [33].

Chapitre 2

Les couverts végétaux

2.1 Définition et rôle

Les couverts végétaux sont depuis longtemps utilisés dans le but de minimiser les effets négatifs du climat pendant l'hiver et le début du printemps sur les sols cultivés. Comme leur nom l'indique, les couverts végétaux sont utilisés afin de ne pas laisser le sol à nu pendant la période séparant deux cultures de rente. Les couverts sont semés immédiatement après la récolte estivale de la culture principale, et après leur croissance pendant l'hiver, ils sont réincorporés au sol avant la culture de printemps suivante [108].

La couche superficielle des sols agricoles (0 - 20 cm) est la zone la plus riche en carbone et en azote organique, ainsi qu'en activité microbienne. Elle influence donc de manière non négligeable la croissance des plantes. Dans la partie superficielle de la plupart des sols agricoles cultivés de manière conventionnelle, la perte de sols et de matière organique (impacts physiques) a provoqué la perte de la réserve de nutriments (impacts chimiques), la déstructuration des sols par la destruction des agrégats et des complexes argilo-humiques, en provoquant une diminution de l'activité microbienne (impacts biologiques) et du cycle des nutriments. L'ajout régulier de matière organique aux sols provoque des changements dans la biomasse microbienne et ne permet d'augmenter les taux de matière organique qu'à des vitesses très lentes. Les couverts végétaux, cultivés pendant la période de jachère, permettent d'améliorer la dynamique des nutriments dans cette couche de surface, en réaugmentant les taux de matière organique, l'activité microbienne, la stabilité des agrégats et l'infiltration de l'eau [113].

Les couverts végétaux exercent une influence sur des facteurs biotiques (e.g. interactions entre microorganismes, interactions plante-maladies), mais également abiotiques (e.g. paramètres physicochimiques du sol). Ils permettent de préserver la qualité des sols grâce à leur effet de lutte contre l'érosion et le lessivage des éléments nutritifs (comme l'azote minéral), notamment en captant ces derniers avant qu'ils ne soient lessivés. Ils exercent également des influences sur des caractéristiques physicochimiques du sol : ils permettent d'augmenter le taux d'infiltration de l'eau dans le sol, et d'augmenter la disponibilité en nutriments. De plus, la présence de racines et d'hyphes de champignons qui leur sont associées permet la stabilisation des microagrégats du sol [98]. Grâce aux exudats sécrétés par les racines des plantes, certaines espèces sont utilisées comme couverts végétaux afin de lutter contre les adventices et les microorganismes nocifs du sol. La culture de couverts végétaux permet également d'apporter du carbone au sol, en maintenant ainsi les taux de matière organique de ce dernier [39]. Certaines espèces utilisées dans les mélanges de couverts végétaux servent d'hôtes aux champignons my-

corhiziens à arbuscules (CMA) et permettent ainsi de maintenir ou d'augmenter l'inoculum mycorhizien pour la culture suivante [52], [70]. Les couverts végétaux sont donc un outil essentiel dans la gestion durable des agroécosystèmes rendant possible la minimisation de la dégradation environnementale [113].

2.2 Services écosystémiques

Les cultures intermédiaires, synonymes de cultures dérobées, sont les cultures semées entre la récolte d'une culture d'hiver et le semis d'une culture de printemps sans rien changer à la rotation. Les couverts végétaux sont donc concernés par cette définition. On distingue différents types de couverts végétaux en fonction de leur rôle et de leur usage. Ils peuvent être récoltés ou parfois pâturés, dans ce cas, ils sont constitués de légumineuses ou de fourragères. Quand le couvert végétal n'est pas récolté, il existe différents types de cultures intermédiaires en fonction du rôle qu'elles remplissent. Les services écosystémiques fournis par les couverts végétaux sont nombreux et diversifiés.

Les "Cultures Intermédiaires Piège à Nitrate (CIPAN)" sont semées après la récolte de la culture de rente dans le but de récupérer les engrais non prélevés par la culture précédente et potentiellement lessivables pendant l'hiver. En l'absence de couverts pendant l'hiver, les nitrates peuvent être entraînés dans les sols par les pluies et atteindre finalement les nappes d'eaux souterraines [17]. Les Brassicacées sont efficaces pour capturer l'azote et diminuer son lessivage grâce à la couverture rapide du sol qu'ils permettent d'obtenir. Les plantes de la famille des Graminées sont également intéressantes pour le prélèvement de nutriments potentiellement lessivables. De plus, sachant que l'azote est souvent l'élément limitant pour la croissance des plantes, leur culture dans des milieux riches en nitrates permet la production d'une biomasse abondante et donc un apport important en matière organique pour le sol [20].

Les "engrais verts", une fois détruits, sont enfouis dans le sol et vont libérer progressivement une partie de l'azote et des nutriments qu'ils ont immobilisé dans leur biomasse par des processus dits de minéralisation et d'humification. La minéralisation représente le processus de transformation d'éléments organiques (C, N, S, P) en composés inorganiques (CO_2 , CH_4 , NH_4^+ , NO_3^- , SO_4^{2-} , HPO_4^{2-}) [116]. La vitesse de restitution des éléments nutritifs au sol dépend de la nature du couvert, de son stade de développement, et de sa date de destruction [17]. Le processus d'humification, faisant référence à la transformation de biomasse identifiable macromorphologiquement en composés humiques amorphes, joue un rôle important dans le cycle du carbone et dans la structuration des sols [116]. Les légumineuses sont d'un grand intérêt dans la composition de couverts végétaux car leur capacité de fixation biologique de l'azote permet de remplacer, ou tout au moins de diminuer les apports nécessaires pour la culture suivante, à condition qu'elles soient restituées au sol en fin de culture [17].

Les couverts végétaux peuvent également jouer un rôle important dans la diminution des effets de la compaction : les racines s'enfonçant dans le sol, une fois décomposées, auront créé de nombreux petits canaux qui constitueront un accès facilité pour le développement des racines de la culture suivante. Ces canaux favoriseront également une meilleure rétention de l'eau par le sol. Un enracinement plus profond et plus facile des cultures suivantes rendra possible un meilleur accès à l'eau lors des périodes de sécheresse [109]. Les impacts des couverts végétaux sur la structure du sol permettront l'obtention de rendements plus importants par la culture suivante.

La lutte contre les adventices peut être un des rôles joués par la présence d'un couvert végétal. Les résidus des couverts végétaux peuvent supprimer l'apparition des adventices les plus précoces, cependant, ils permettent difficilement le contrôle total des adventices pendant l'entièreté de la saison culturale à cause de l'hétérogénéité de la couche de résidus [96]. L'utilisation de plantes de la famille des Brassicacées est largement répandue en culture de couverts végétaux grâce à leur capacité à synthétiser et à libérer des glucosinolates, riches en soufre, qui, après dégradation, sont transformés en composés biotoxiques comme les isothiocyanates [70]. Ces derniers composés présentent l'avantage de réaliser un contrôle des adventices, de certaines maladies et d'insectes nuisibles, ainsi que de nématodes parasites. Selon Teasdale (1996) [96], cette suppression des premières adventices permettrait l'installation de la culture principale et donc la limitation de l'utilisation d'herbicides à la lutte contre les adventices apparaissant plus tardivement. On pourrait ainsi remplacer les herbicides de pré-émergence qui sont plus nocifs pour l'environnement par une application fortement réduite d'herbicide de post-émergence. Kabir et Koide (2000) [51] ont conclu d'après les expériences qu'ils ont réalisées, que la gestion adéquate des adventives mycotrophes peut apporter des avantages écologiques et économiques, en rendant possible la survie des populations de CMA entre la période séparant une culture de rente de la suivante. Ce service apporté par les couverts végétaux, bien qu'il ne soit pas le principal avantage, permettrait de s'affranchir de la dépendance importante actuelle aux herbicides, ainsi que des problèmes liés à l'apparition de résistances des adventices aux produits de synthèse.

Ces deux dernières caractéristiques des couverts végétaux, à savoir diminution de la compaction et lutte contre les adventices, permettent de diminuer le nombre de passages au labour. Le labour est une pratique agricole vieille de huit mille ans et actuellement largement répandue dans la gestion des agroécosystèmes. Il est réalisé dans le but d'incorporer dans le sol les résidus de culture afin d'améliorer leur décomposition, de préparer la terre pour la mise en place de la culture suivante, d'augmenter la porosité du sol, et de contrôler les adventices [115]. Bien que cette pratique soit nécessaire dans de nombreuses situations, elle accélère la dégradation des sols et provoque des dommages importants sur l'environnement [108]. Le labour favorise l'oxydation accélérée de la matière organique, la compaction des sols, la destruction de la macrofaune, et sur le long terme, augmente l'érosion. De plus, le labour implique une consommation d'énergie importante, et provoque des dégâts importants liés à l'érosion comme les coulées de boue [22], [115]. L'intégration des couverts végétaux dans les rotations dans un objectif de lutte anti-érosive favorise la conservation des ressources du sol. En effet, la protection contre l'érosion par la diminution du ruissellement est une propriété essentielle des couverts végétaux qui bénéficie à la conservation des sols.

Par les sécrétions de leurs racines, les couverts végétaux jouent également un rôle dans l'amélioration de la structure des sols. L'augmentation de la stabilité des agrégats du sol serait due à la quantité supérieure de carbone présente dans le sol grâce à la présence de couverts végétaux qui favorisent ainsi le développement des communautés de microorganismes dont les sécrétions d'hydrates de carbone à haut poids moléculaire permettent l'augmentation de la stabilité des particules de sol [85]. Bien que les racines libèrent des quantités importantes de C inorganique qui influence directement la biogéochimie du sol, c'est la libération de C organique qui produit les changements les plus importants dans la nature physique, biologique et chimique des sols. La libération de C organique est appelée rhizodéposition. Ce terme inclut une large gamme de processus par lesquels le C rentre dans le sol. Il existe six sites principaux de rhizodéposition (Figure I.1) : (1) détachement de cellules de la coiffe et du bord de la racine,

(2) sécrétion de mucilage insoluble, (3) sécrétion d'exsudats solubles, (4) pertes de C organique volatile, (5) transfert de C vers des organismes symbiotiques (CMA) et (6) perte de C par la mort et la lyse de cellules racinaires épidermiques [49].

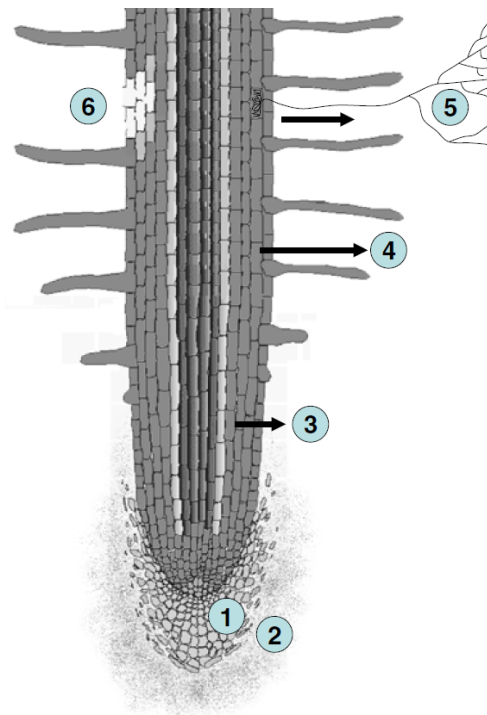


FIGURE I.1 – *Représentation schématique d'une section longitudinale de racine montrant les six types de rhizodéposition [49].*

D'abord considérés comme une contrainte par les agriculteurs, les couverts végétaux ont maintenant prouvé les bénéfices qu'ils apportaient aux agroécosystèmes et leur impact positif est maintenant largement reconnu. Ces cultures intermédiaires favorisent également la biodiversité en stimulant l'activité biologique des sols et en fournissant des refuges et de l'alimentation à la macrofaune [113], le maintien des taux d'humus, ou encore la limitation de la battance. En outre, certains couverts végétaux peuvent également être valorisés comme fourrage d'appoint par les agriculteurs [17].

Les agriculteurs reconnaissent souvent le coût supplémentaire entraîné par l'addition de couverts végétaux dans le cycle de rotation. Par manque d'information et d'exemples, de nombreux agriculteurs considèrent que le recours à des couverts végétaux ne vaut pas la peine par rapport aux coûts et à la complexité additionnels liés à leur incorporation dans le cycle de culture [108]. Dès lors, de nombreuses recherches ont été réalisées sur ce sujet, partout dans le monde, afin d'étudier les bénéfices apportés par les couverts végétaux. Lors de la mise en place de pratiques d'agriculture durable, il est essentiel d'analyser la productivité économique. Les coûts directs et indirects (source ou augmentation de maladies, retards dans le programme cultural) doivent être évalués et comparés aux bénéfices, à court et à long terme, apportés par les couverts végétaux à la dynamique des nutriments dans le sol (diminution des intrants chimiques et des engrais) [113]. Finalement, une bonne gestion des couverts végétaux consisterait à mélanger différentes espèces de plantes de familles différentes afin de combiner plusieurs avantages, avec toutefois une certaine incompatibilité entre récolte et engrais vert.

2.3 Réglementation

L'implantation de couverts végétaux en Belgique suit des réglementations précises. En Wallonie, dans le cadre du Programme de Gestion Durable de l'Azote (PGDA), après tout épandage d'azote organique réalisé entre le 1^{er} juillet et le 15 septembre, une Culture Intermédiaire Piège à Nitrate (CIPAN) doit être implantée pour le 15 septembre et maintenue au moins jusqu'au 15 novembre. Les politiques environnementales de l'Union Européenne ont été à l'origine de la mise en place de la directive 91/676/CEE de 1991. Cette directive «nitrates» constitue l'un des premiers instruments législatifs de l'UE visant à protéger les eaux contre la pollution par les nitrates à partir de sources agricoles [80].

En zone vulnérable [80], 90% de la superficie des terres récoltées avant le 1^{er} septembre et emblavées après le 1^{er} janvier suivant doit être couverte par une CIPAN durant l'automne. Celle-ci peut contenir jusqu'à 50% de légumineuses en poids des semences. Les zones vulnérables concernent les territoires dont les teneurs en nitrates des eaux souterraines dépassent 50 mg/l ou risquent de dépasser cette valeur. Ces zones établissent un périmètre de protection des eaux souterraines et de surface contre les nitrates d'origine agricole.

2.4 Choix du couvert végétal

Une seule espèce ne répond jamais à tous les critères recherchés par l'agriculteur ; le recours à des mélanges d'espèces permet de combiner les différents aspects et bénéfices apportés par chaque espèce de plante constituant le couvert. Les légumineuses jouent un rôle important dans le cycle de l'azote grâce à leur association avec des bactéries fixatrices d'azote [16] ; les Graminées sont importantes dans la structuration du sol en surface, et sont complémentaires au radis ou au tournesol qui présentent des effets structurants plus en profondeur ; la moutarde, de la famille des Brassicacées, est souvent utilisée pour sa facilité et sa vitesse d'installation [113]. La réalisation de mélanges permet également de donner lieu à des compensations si une espèce de plantes rencontre des conditions adverses et se retrouve présente en insuffisance. Les mélanges garantissent donc la réussite de l'implantation du couvert, son développement optimal, ainsi que l'accumulation des bénéfices pour la culture suivante [17].

La date de semis (Annexes, Figure V.1) et le choix des espèces constituant le mélange de couverts végétaux vont déterminer la vitesse de couverture du sol et la production de biomasse. La date de destruction du couvert aura également un impact sur les bénéfices apportés à la culture suivante. Il est important de réaliser des associations d'espèces qui présentent des exigences proches quant aux techniques de semis et de destruction, ainsi qu'en termes de vitesse de développement, afin de ne pas favoriser une espèce au détriment d'une autre. Il est également nécessaire de respecter les réglementations concernant le choix des espèces et des dates de semis et de destruction. Le choix de tous ces facteurs est donc délicat et demande une attention particulière de la part de l'agriculteur.

Le type de destruction peut beaucoup varier selon le matériel dont l'agriculteur dispose, le mode de gestion de l'exploitation, etc... et est également inséré dans un contexte réglementaire. Il doit être adapté selon les conditions climatiques du moment. C'est l'espèce la plus difficile à détruire qui déterminera le type de destruction dans le cas des mélanges d'espèces. La destruction peut être réalisée par le gel, de manière mécanique (labour, travail du sol, broyage, roulage ou hersage), ou encore par voie chimique [17]. La moutarde, la phacélie, le trèfle d'Alexandrie, la

vesce, le pois, la féverole, le nyger, le sarrasin, le tournesol et le radis chinois (Annexes, Tableau V.1) sont sensibles à la destruction par le gel. Cette méthode présente l'avantage d'être peu coûteuse, de préserver la structure du sol, et de ne pas provoquer de dommages à l'environnement. Les graminées comme l'avoine, elles, sont moins sensibles à ce moyen de destruction ; le déchaumage donne des résultats efficaces. Le labour peut être utilisé comme moyen de destruction pour tous types d'espèces [17].

Les critères déterminant le choix du couvert végétal sont également fonction de facteurs comme le type de rotation, les caractéristiques agronomiques de chaque espèce, les conditions pédoclimatiques de la région, et varient selon le type de service recherché : piège à nitrates, engrais vert, lutte contre l'érosion, effet structurant, contrôle des adventices, production de fourrage, etc... Le mode de gestion de l'exploitation (conventionnel, non-labour, agriculture biologique), l'organisation du travail de l'agriculteur ainsi que le matériel disponible et les moyens financiers vont également avoir une influence sur le choix du couvert [17].

Les mélanges les plus souvent utilisés dans un but de piégeage des nitrates sont constitués de moutarde et graminées (avoine par exemple), de moutarde et phacélie ou d'avoine et phacélie. Ces types de mélange permettent de produire rapidement une biomasse importante, adaptée à une large gamme de conditions climatiques. Les Brassicacées présentent l'avantage de se développer rapidement, et sont utilisées dans les cas de reliquats importants, tandis que les graminées, dont la croissance est plus lente, sont utilisées dans les cas où la minéralisation se produit tardivement [17]. Quand la fonction visée est un effet "engrais vert", c'est-à-dire fournir à la culture suivante des éléments fertilisants (l'azote principalement), les mélanges cultivés sont constitués d'espèces utilisées pour le piégeage de nitrates auxquelles sont ajoutées des légumineuses. Ces mélanges peuvent contenir des mélanges d'avoine, vesce et pois, d'avoine et féverole, ou encore de phacélie et trèfle [17]. Des mélanges de couverts dont les espèces présentent différents types de disposition du système racinaire complémentaires dans l'espace sont semés dans le but d'avoir un effet structurant sur le sol. Les mélanges les plus utilisés sont : radis, phacélie et tournesol ; radis, phacélie et vesce, ou encore ; avoine, tournesol, vesce, moutarde, phacélie, lin et trèfle. Ces types de mélanges sont également retrouvés dans les cas où l'impact recherché est la lutte contre les adventices [17]. Finalement, il existe également des mélanges semés dans le but de la production de fourrage d'appoint et de qualité. Ceux-ci peuvent être constitués d'avoine et légumineuses (trèfle, vesce, pois), de seigle et légumineuses, de ray-grass et trèfle, ou encore de moha et trèfle [17].

Njeru *et al.* (2013) [70] ont démontré que *Vicia villosa* constitue un couvert végétal intéressant dû à sa bonne accumulation d'azote, et que cette plante représentait une source d'azote plus efficace qu'un couvert composé par un mélange de sept espèces de plantes, toutes n'étant pas des légumineuses. Ce meilleur prélèvement d'azote pourrait être dû entre autres à une meilleure colonisation par les champignons mycorhiziens à arbuscules (CMA). Le choix des espèces constituant le couvert végétal a donc une influence importante sur le potentiel mycorhizien du sol et sur la colonisation racinaire de la culture suivante. De plus, le choix des espèces de plantes appropriées (plantes hôtes de CMA ou plantes non nuisibles aux CMA) composant le couvert est plus important que la diversité des espèces le constituant dans les systèmes d'agriculture biologique [70].

La composition de mélanges de couverts demande une attention particulière afin d'ajuster au mieux les rapports des éléments nutritifs que chaque espèce va apporter au sol. L'azote

disponible pour la culture suivante peut être quantifié par l'indice C/N. Cet indicateur représente le rapport carbone sur azote. Un rapport C/N faible des résidus de couverts végétaux est synonyme d'un taux de minéralisation élevé, ce qui permet une disponibilité immédiate en azote pour la culture suivante. Ce rapport est faible pour les légumineuses ; en effet, leur biomasse est riche en azote. Environ la moitié de cet azote sera minéralisé à court et à moyen terme. Quand le rapport C/N est élevé (au-delà de 25), comme dans le cas de couverts lignifiés comme la moutarde ou les pailles, la phase de décomposition peut nécessiter une mobilisation importante d'azote qui se fera au détriment de la culture suivante. Ce phénomène est connu sous le nom de "faim d'azote". Un apport additionnel d'azote lors de la fertilisation sera alors nécessaire [17]. Les couverts végétaux présentant cette caractéristique sont peu conseillés car l'immobilisation de l'azote disponible du sol peut retarder les premières phases de croissance de la culture suivante [113].

Les types d'avoine utilisés sont l'avoine blanche et brésilienne, les types de moutarde sont la moutarde blanche et brune, les types de trèfle sont le trèfle blanc, violet, incarnat et d'Alexandrie, les pois peuvent être de printemps et d'hiver, les radis chinois ou fourragers, et les vesces communes, de printemps, d'hiver ou velues [17] (Annexes, Tableau V.1).

Chapitre 3

Les champignons mycorhiziens

3.1 Définition et différents types

Le terme mycorhize (du grec *mykès*, champignon, et *rhiza*, racine) est utilisé la première fois par l'allemand Albert Bernhard Frank, en 1885 [90], [100], pour décrire une symbiose au sein de laquelle la plante et le champignon dépendent l'un de l'autre. Il existe différents types de mycorhizes : sept sont généralement reconnus. On trouve les ectomycorhiziens, les endomycorhiziens, dont les champignons mycorhiziens à arbuscules (CMA), les ectendomycorhiziens, les mycorhizes arbutoides, les mycorhizes monotropoïdes, les mycorhizes des Éricacées, et les mycorhizes des Orchidées [77], [92].

Les ectomycorhizes, prédominantes chez les arbres des forêts tempérées, sont caractérisées par le fait qu'elles ne pénètrent pas les cellules de la plante partenaire de la symbiose. Elles forment un manteau fongique autour des racines des plantes : le réseau de Hartig. Celui-ci se développe à partir du manteau en formant un réseau d'hyphes entre les cellules corticales des racines. Le mycélium extra-racinaire réalise la connexion entre le sol et la racine [75], [77].

Les endomycorhizes pénètrent les cellules de la plante hôte et forment des structures d'échange spécialisées. Sur base de critères morphologiques, deux groupes sont distingués. D'une part, les champignons mycorhiziens à arbuscules (CMA), qui sont caractérisés par la formation d'un réseau d'hyphes extra- et intraracinaires, et qui pénètrent les cellules en traversant la paroi des cellules racinaires des plantes hôtes, pour finalement former des arbuscules, des structures spécialisées dans l'échange des nutriments. Ils réalisent les symbioses les plus répandues ; au vu de leurs rôles essentiels dans le fonctionnement des écosystèmes, ils seront étudiés au cours de ce travail. Les hyphes sont capables d'explorer un volume de sol mille fois supérieur à celui exploré par des racines non mycorhizées. Il existe deux types de mycorhizes à arbuscules : le type *Arum*, qui forme des hyphes se développant longitudinalement entre les cellules, et le type *Paris*, qui présente des hyphes se propageant de cellule en cellule [77]. D'autre part, les mycorhizes à pelotons, qui se différencient par la formation de pelotons à partir de l'enroulement d'hyphes sur eux-mêmes dans les cellules du cortex [75].

Les CMA colonisent plus de 80% des plantes terrestres vasculaires [88]. Leur classification phylogénétique est la suivante [87], [88], [92] : règne : *Fungi*, phylum : *Glocceromycota*, classe : *Glomeromycetes*. Quatre ordres sont décrits : les *Glomerales*, les *Diversisporales*, les *Archaeosporales*, et les *Paraglomerales*. Ils sont classifiés au sein de 12 familles. Aujourd'hui, 33 genres et 314 espèces de CMA ont été décrits [87]. Sur base de caractéristiques moléculaires, morpho-

logiques et écologiques, il a été établi en 2001 que les CMA avaient une origine monophylétique [88]. L'origine et l'évolution des CMA est directement reliée à celle des plantes terrestres. L'origine des CMA remonte au moins à 460 millions d'années [83]. Les premières plantes terrestres étaient déjà colonisées par ces champignons qui auraient permis leur passage de la vie aquatique à la vie terrestre, ce qui explique leur très large couverture d'associations avec les plantes [65]. Leur spectre d'hôtes est donc très large, en formant des symbioses avec les Angiospermes, les Gymnospermes, les Sporophytes et les Ptéridophytes. Certaines familles de plantes comme les Brassicacées, les Chenopodiacees et les Caryophyllacées sont peu colonisées par ces champignons. Dans cette association, le champignon fournit des éléments minéraux et de l'eau à la plante, qui, en échange, apportera à ce dernier des composés carbonés issus de la photosynthèse (jusqu'à 30% [26]).

Les ectendomycorhiziens présentent des structures des ectomycorhizes et des endomycorhizes. Ce type de champignon réalise des associations avec les conifères. On distingue également les arbutoïdes, qui forment un manteau, un réseau de Hartig et des pelotons ; les monotropoïdes, qui réalisent des associations avec les plantes achlorophylles hétérotrophiques et qui sont capables de former un manteau, un réseau de Hartig, des hyphes et des chevilles [90] ; les mycorhizes des Orchidées, présentes uniquement chez cette famille de plantes ; et finalement, les mycorhizes des Éricacées, qui ne colonisent que les plantes de l'ordre des Éricales [77].

3.2 Structures des champignons mycorhiziens à arbuscules (CMA)

Les arbuscules (du latin *arbusculum*, petit arbre) (Figure I.2) sont formés par une succession de ramifications dichotomiques à partir d'hyphes intracellulaires à l'intérieur d'une cellule végétale racinaire. Ceux-ci sont formés après avoir traversé la paroi cellulaire, en formant de nombreuses invaginations avec la membrane plasmique qui permettent la création d'un site d'échange actif entre la cellule végétale et le CMA : ils connectent intimement la plante au réseau d'hyphes de CMA. Ces structures sont formées à partir de deux jours après la colonisation racinaire et peuvent être fonctionnels pendant deux à quatre jours [7].

Chaque branche d'un arbuscule formée dans une cellule de plante est entourée par une membrane périarbusculaire qui forme un continuum avec la membrane plasmique de la plante et exclut ainsi le champignon du cytoplasme des cellules de la plante (Figure I.3). L'espace périarbusculaire constitue l'interface apoplastique entre la membrane plasmique du CMA et la membrane périarbusculaire de la plante. Cet espace est donc constitué de matériel fongique et végétal. La membrane périarbusculaire et la membrane plasmique du CMA sont riches en transporteurs actifs spécifiques au phosphate, à l'ammonium et aux hexoses [75].

Les vésicules sont formées à partir de renflements d'hyphes intraracinaires et contiennent des teneurs importantes en lipides et en noyaux (fonction de stockage d'énergie et de matériel génétique). Les vésicules peuvent être intercellulaires ou intracellulaires. Ces structures ne sont rencontrées que chez certaines familles de champignons comme les Acaulosporaceae et les Glomeraceae. Les vésicules peuvent constituer des abris pour les bactéries.

Les hyphes sont à la fois présents à l'intérieur mais également à l'extérieur de la racine. Ils sont non sseptés (coenocytiques), avec des centaines de noyaux partageant le même cytoplasme

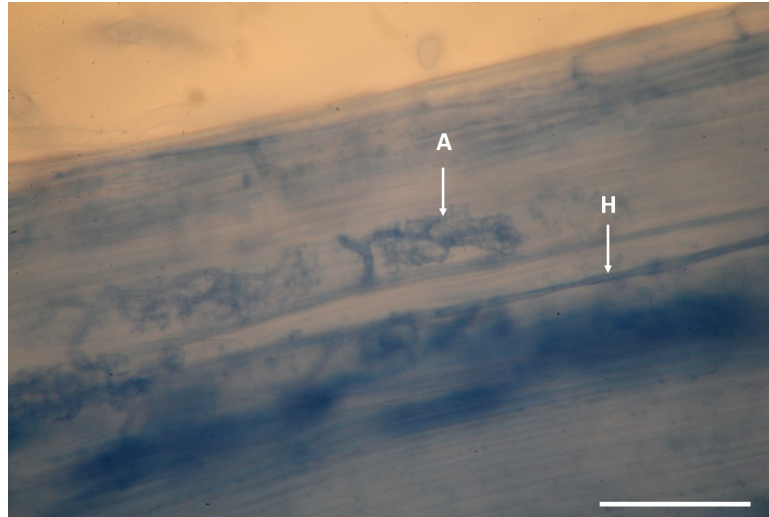


FIGURE I.2 – *Arbuscules (type Arum) (A) et hyphes (H) à l'intérieur d'une racine de maïs, 400 X. Échelle : 100 µm. Photo : Isaure Lohest.*

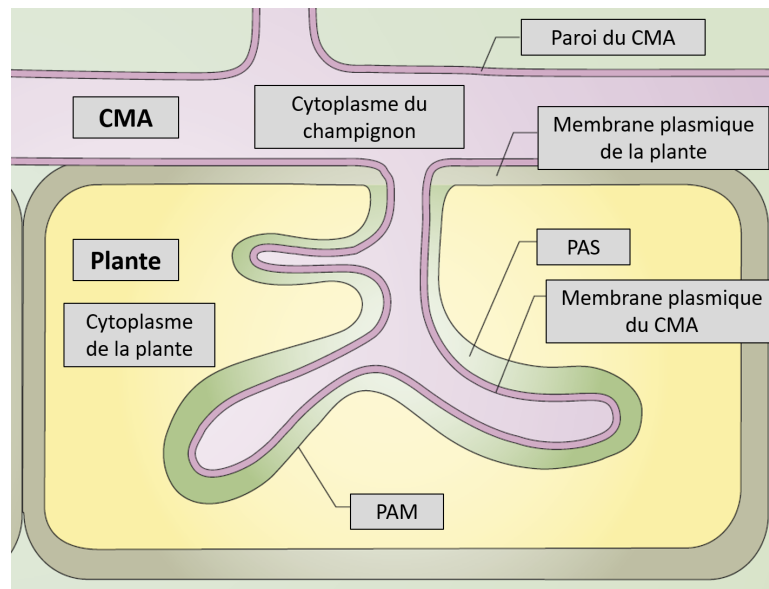


FIGURE I.3 – *Représentation schématisée d'un arbuscule dans une cellule racinaire. PAM : membrane pérarbusculaire, PAS : espace pérarbusculaire. Adapté de : Parniske (2008) [75].*

[99]. Les hyphes permettent le prélèvement des éléments minéraux du sol vers la plante hôte. Ils vont exercer une influence sur les caractéristiques du sol, en modifiant le pH et en augmentant la disponibilité des minéraux. Ils sont également à l'origine de la colonisation de nouvelles racines et de la formation des spores et de vésicules. Aucun stade sexué n'a été reporté jusqu'à présent chez les CMA. Bien que les spores puissent germer en absence d'hôtes, les CMA sont des biotrophes obligatoires : ils dépendent d'un partenaire photoautotrophe afin de compléter leur cycle de vie [92].

Les spores sont les structures multinucléées ayant une fonction de survie et de dispersion du champignon. Elles sont formées à l'extérieur ainsi qu'à l'intérieur de la racine colonisée. Les spores contiennent des lipides et de nombreux noyaux. Elles peuvent contenir des bactéries. Leur membrane et leur couleur permettent de réaliser l'identification morphologique des espèces

de CMA [77].

3.3 Cycle de développement

La colonisation racinaire est réalisée à partir de la germination de propagules présentes dans le sol, comme des spores ou des hyphes provenant de racines déjà colonisées. L'établissement de la symbiose est le résultat d'un mécanisme complexe et encore peu connu impliquant des changements majeurs dans l'expression des gènes de la plante et du champignon. L'établissement de la symbiose entre la plante et le champignon peut être divisé en trois grandes étapes, toutes régulées finement par un dialogue entre les deux partenaires de la symbiose.

Le développement de la mycorhize commence par l'étape présymbiotique qui se réfère à l'étape avant le contact entre le CMA et la racine. Cette première phase du développement de la symbiose est caractérisée par la croissance continue des hyphes, une activité physiologique intense et une ramification importante des hyphes. Les exsudats racinaires constitués de strigolactones et d'hormones végétales sont responsables de l'induction de la ramification et des changements dans la physiologie et dans l'activité mitochondriale du champignon. Ces produits induisent également la germination des spores en stimulant le métabolisme du champignon. Les strigolactones sont des composés labiles et le gradient de concentration permet de constituer un indicateur de la proximité par rapport à la racine. C'est la perception des strigolactones par le champignon qui induit la phase présymbiotique [75]. Ensuite, a lieu le premier stade de la symbiose, se référant à l'étape de formation de l'hyphopodium (ou appressorium) à la surface de la racine ainsi qu'à la colonisation de la racine avant le développement des arbuscules/vésicules. L'hyphopodium permet au CMA de pénétrer les cellules végétales épidermales jusqu'au cortex. La pénétration du champignon dans la plante hôte est favorisée par la production d'enzymes comme les cellulases, les xyloglucanases ou les polygalacturonase qui aident à dissoudre la paroi des cellules végétales. La colonisation de la plante implique donc des mécanismes mécaniques et enzymatiques ainsi que la coordination avec le fonctionnement de l'hôte afin d'assurer la réussite de la pénétration. Cette deuxième étape est stimulée par des molécules de signal émises par le champignon, les facteurs *Myc*, qui induisent des réponses spécifiques à la symbiose dans la racine de la plante hôte. Les facteurs *Myc* vont induire l'expression de gènes de la plante spécifiques à la symbiose qui vont eux-mêmes déclencher des changements phénotypiques dans les racines [7]. Finalement, a lieu le stade avancé de la symbiose, pendant lequel l'espace intercellulaire des cellules des racines est colonisée par les arbuscules et les vésicules formés par le CMA (Figure I.4) [29]. La formation de vésicules dépend du genre du CMA [75], [92].

La reproduction des CMA se fait de manière asexuée (aucun stade diploïde n'a jamais été observé), via la formation de spores, elles-mêmes formées par un renflement de certains hyphes extra-racinaires. Les spores renferment à l'intérieur d'une paroi épaissie de nombreux noyaux : ils constituent la forme de survie du champignon [75]. Il a été démontré que le taux de croissance et la capacité d'adaptation aux changements environnementaux des CMA est très différente selon l'espèce considérée. La gestion intensive des sols agricoles comme le labour affecte grandement la composition de la communauté de CMA, cependant la réponse exacte des populations mycorhiziennes aux différents types d'utilisation des terres est sujette à controverse [66].

Tommerup *et al.* (1981) [99] ont réalisé une expérience afin d'étudier la survie des CMA après la mort des cellules végétales hôtes. Les résultats de l'expérience ont montré une croissance de nouveaux hyphes à partir des hyphes se trouvant dans des fragments de racines mortes

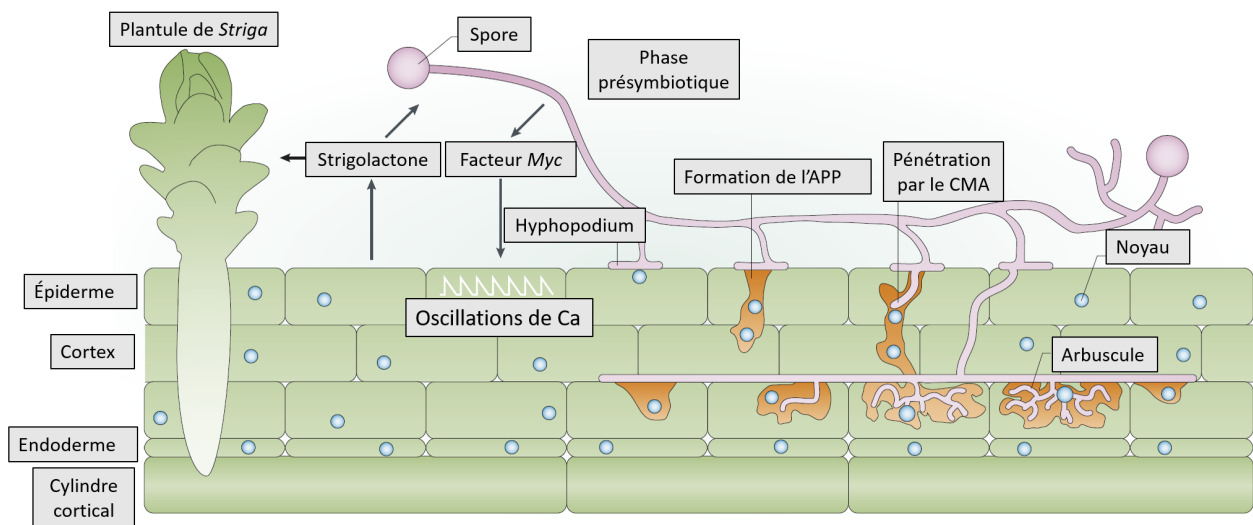


FIGURE I.4 – Étapes du développement d'un CMA. Les racines des plantes exsudent des strigolactones qui induisent la germination des spores et la ramification des hyphes des CMA. Elles peuvent également induire la germination de plantes parasites comme *Striga*. Les CMA produisent des facteurs Myc qui provoquent des oscillations de calcium dans l'épiderme de la racine et activent les gènes de la plante liés à la symbiose. Les CMA forment des appressoria spécialisés, les hyphopodia, qui se développent à partir d'hyphes matures. Suite aux stimulations perçues par la plante, les cellules des racines produisent l'appareil de pré-pénétration (APP). Ensuite, des hyphes se développent à partir de l'hyphopodium et pénètrent l'APP, qui permet le développement du champignon dans les cellules du cortex de la racine. Le CMA va alors pénétrer l'apoplaste et grandir latéralement. Les hyphes vont induire la formation d'autres structures de type APP et vont se ramifier pour produire d'autres arbuscules. Adapté de : Parniske (2008) [75].

pour les espèces *Glomus monosporus*, *Glomus fasciculatus* et *Gigaspora calospora*. Une nouvelle croissance des hyphes a donc été observée à partir des anciens dans le cortex des racines mortes. Finalement, des mycorhizes se sont développées à partir des hyphes. Il a également été observé que le mycélium séparé de sa plante hôte pouvait survivre pendant une durée de deux à quatre semaines. Ceci permet de conclure que pour certaines espèces de CMA, les racines mycorhizées séchées peuvent constituer des propagules [99].

3.4 Composition de la communauté mycorhizienne et diversité d'espèces de plantes hôtes

Les CMA montrent une faible spécificité envers leurs hôtes : une seule plante peut être colonisée par de nombreuses espèces de CMA. La souche de CMA ainsi que la variété ou le cultivar végétal ont une influence sur la spécificité lors de la colonisation. De plus, il a été démontré que les biodiversités des communautés de champignons et de plantes sont corrélées positivement. Les préférences pour certains hôtes jouent un rôle important dans les écosystèmes naturels. Ces préférences pourraient refléter différentes stratégies des CMA ou différentes compatibilités pour leur hôte [75]. Une étude menée par Manoharan *et al.* (2016) [66] en Europe a démontré que le genre *Funneliformis* est plus présent sur des sols agricoles, que *Rhizophagus* est présent sur tous

types de sols mais est plus présent dans les sols peu perturbés comme les prairies permanentes et que *Septoglomus* est également plus fréquent dans les prairies. Les genres *Diversispora* et *Clareidoglomus* sont plus abondants sur les sols cultivés en agriculture biologique, *Glomus* est le genre le plus fréquent dans tous types de sols. Le type d'utilisation du sol a une importance majeure sur la communauté de CMA et a donc un impact de sélection phylogénétique sur les différentes espèces mycorhiziennes. Ceci pourrait avoir comme conséquence un fonctionnement différent des écosystèmes, comme des stratégies de colonisation différentes selon le groupe phylogénétique. Le labour, les fertilisants et les fongicides ont un impact négatif sur la diversité et l'abondance des CMA dans les sols cultivés [66].

Hart et Reader (2002) [38] ont démontré que les membres de la famille des Gigasporacées produisent préférentiellement des hyphes extraracinaires et sont dominants sur des sols pauvres alors que les membres de la famille des Glomeracées ont une tendance plus prononcée à la colonisation racinaire et sont plus fréquemment rencontrés sur des sols plus riches en nutriments [55]. L'effet sur la plante dépend du genre et de l'espèce du CMA. *Glomus mosseae* permet de diminuer la fertilisation phosphatée mais également d'augmenter la résistance de la plante aux pathogènes foliaires [40]. Des compétitions peuvent également exister entre espèces de CMA proches. De plus, il a été observé que les sols des prairies permanentes montraient une diversité de CMA supérieure à celle des sols cultivés de manière intensive [66]. Ceci reflète que les perturbations du sol sont un facteur qui influence grandement la composition de la communauté mycorhizienne.

Les estimations actuelles de la distribution taxonomique des CMA sont évaluées à partir de la distribution des plantes hôtes et des facteurs climatiques [74]. Cependant, des conditions climatiques locales ainsi que des interactions entre CMA influencent de manière non négligeable la diversité à l'échelle locale. La distribution des CMA est également influencée par des paramètres environnementaux comme le type de sol, sa texture, l'humidité, la température, la disponibilité en nutriments ou encore le niveau de perturbation. En analysant les séquences d'ADN dans différents sites, Kivlin *et al.* (2011) [55] ont observé que la diversité globale d'espèces était six fois supérieure aux estimations existantes basées sur des critères morphologiques, si le taux de similarité était fixé à 99%. De plus, la communauté de plantes était reliée à la structure de la communauté mycorhizienne mais n'expliquait qu'une petite partie de sa composition. Les espèces de CMA avaient également une tendance à être regroupées phylogénétiquement selon le site observé, montrant ainsi que l'habitat a une influence sur la composition de la communauté de microorganismes. De plus, les CMA sont en interaction avec les autres organismes du sol dans la rhizosphère comme les bactéries, les protistes, et les nématodes, ce qui influence la composition de la communauté de CMA à petite échelle.

Chapitre 4

Interactions plantes - CMA

Les biotes bénéfiques du sol sont à l'origine de nombreux services écosystémiques et constituent des éléments clé de la fertilité des sols et de la productivité des systèmes agricoles. En établissant des symbioses avec les racines de la plupart des plantes terrestres (80% des plantes terrestres vascularisées [88]), les CMA appartiennent à l'un des groupes de microorganismes bénéfiques du sol les plus importants. Les CMA fournissent de nombreux services écosystémiques qui vont avoir un impact bénéfique sur le développement des plantes hôtes, comme le prélèvement de nutriments dans le sol, la participation à la formation d'agrégats de sol, la séquestration de carbone grâce à un réseau hyphal dense se répandant des racines colonisées au sol avoisinant. Ils sont aussi nommés les "ingénieurs des agroécosystèmes" [12].

Les CMA forment des symbioses avec les plantes : celles-ci fournissent des hydrates de carbone au champignon (jusqu'à 30% du carbone fixé par la plante [26]), qui, en échange, va fournir à la plante des éléments minéraux et de l'eau puisés dans le sol. Cet échange est réalisé grâce aux arbuscules, les structures symbiotiques caractéristiques formées par le champignon à l'intérieur des cellules du cortex des racines des plantes, en forme de petit arbre, dont la fonction consiste en la réalisation des échanges métaboliques entre les deux acteurs de la symbiose.

4.1 Effet des CMA sur les agroécosystèmes

L'association d'une plante à un CMA permet à celle-ci d'explorer un volume de sol considérable, bien supérieur à celui qui serait en contact avec une racine non mycorhizée. Les plantes mycorhizées ont une capacité d'absorption des nutriments supérieure par rapport à celles qui ne réalisent pas de symbiose. Les hyphes des CMA réalisent la connexion entre le sol et les racines ; ils grandissent en dehors des racines et permettent d'augmenter considérablement la surface d'absorption. Le volume de sol exploré est donc supérieur pour le prélèvement d'éléments nutritifs du sol. Les hyphes agissent comme des extensions du système racinaire des plantes qui permettent l'amélioration de l'acquisition de nutriments immobiles comme le P, le Zn, et le Cu, mais également d'autres éléments mobiles comme le S, le Ca, le K, le Fe, le Mg, le Mn, le Cl, le Br ou encore l'N [63]. La productivité de la plante est donc augmentée [101]. Les plantes hôtes de CMA ont donc le potentiel de réduire (par rapport aux plantes non mycotrophes) les risques de lessivage des éléments grâce au meilleur accès aux nutriments qu'ils fournissent à leur plante hôte (Figure I.5).

Le phosphore est un élément essentiel pour les plantes, cependant, il est souvent limitant dans les sols. De plus, le phosphore est transporté dans les racines par un mécanisme de dif-

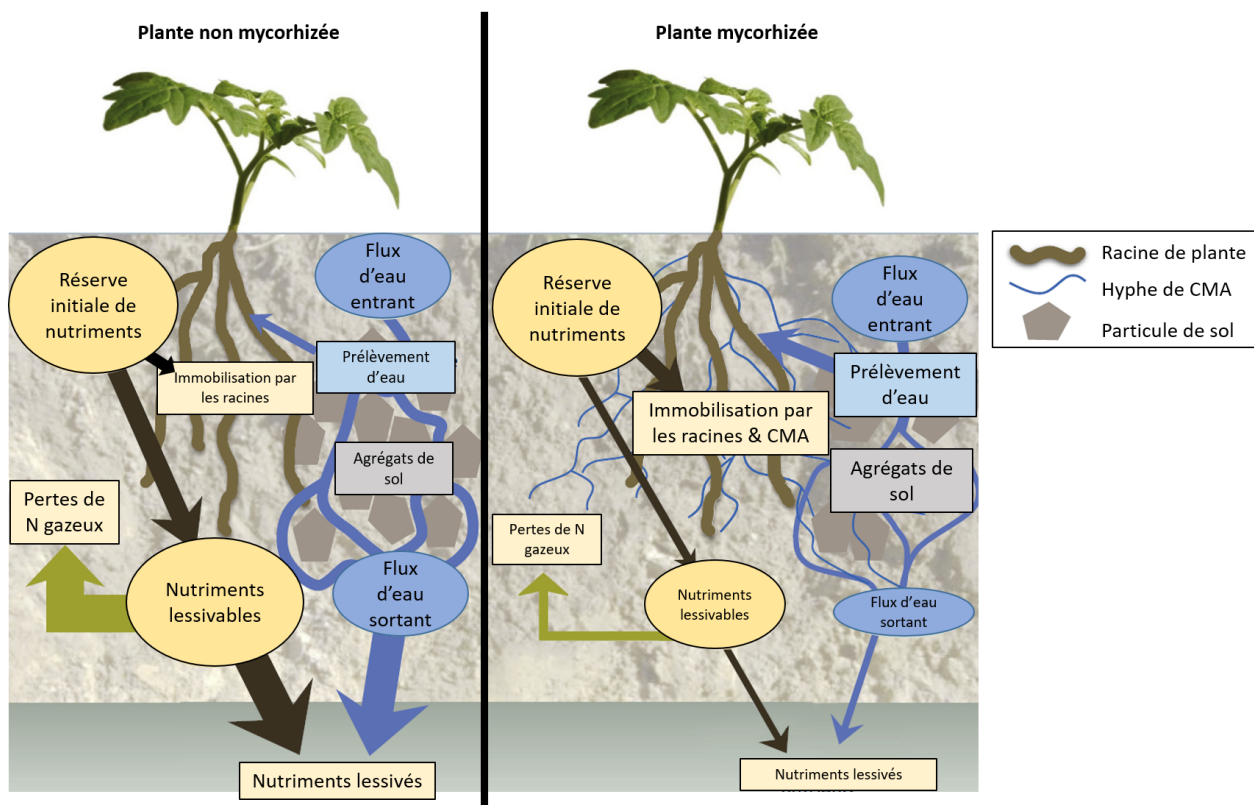


FIGURE I.5 – Rôle des CMA dans la diminution de la perte de nutriments par lessivage. Adapté de : Cavagnaro et al. (2015) [13].

fusion, mais le coefficient de diffusion du phosphore est très faible (dix fois plus faible que celui du K et du NH_4^+ , et cent fois plus faible que celui du NO_3^-). De plus, le phosphore a une haute affinité pour la fixation sur les minéraux du sol. Cet élément est donc souvent retrouvé à de très faibles concentrations à proximité de la racine [50]. La présence de réseaux de CMA en association avec les racines des plantes permet donc d'améliorer de manière significative le prélèvement de cet élément dans le sol. Cependant, à des niveaux de phosphore élevés dans le sol, l'association avec des CMA peut être défavorable pour la plante, en effet, les plantes n'ont pas besoin des mycorhizes pour l'absorption du phosphore, et ceux-ci consomment du carbone issu de la plante hôte pour leur propre développement.

La croissance d'une plante hôte peut être affectée par la colonisation mycorhizienne si le phosphore assimilable représente l'élément limitant pour le développement des plantes. L'établissement de cette symbiose permet donc d'élargir la rhizosphère à la mycorhizosphère, qui englobe le sol à proximité des mycorhizes bénéficiant d'une activité microbienne améliorée. Les interactions microbiennes se produisant dans la mycorhizosphère impliqueraient une grande variété de bactéries et de champignons comme des microorganismes anaérobies strictes ou facultatifs, des producteurs de chitinase extracellulaire, des solubilisateurs de phosphate, des producteurs de sidérophores, d'antibiotiques, d'hormones, des supresseurs de la pathogénicité, des promoteurs de la croissance des plantes, etc. La microflore aurait également une influence sur la formation de CMA [63].

Les effets des CMA sur la plante hôte sont plus visibles sous des conditions limitantes en

disponibilité des nutriments. En effet, la colonisation racinaire des plantes est plus faible lorsque les nutriments sont présents en abondance. De plus, il a été démontré que la colonisation racinaire par des CMA provoque une inhibition des organismes pathogènes grâce à l'induction des défenses naturelles de la plante. La régulation des réponses de la plante se fait par les voies de l'acide salicylique et du jasmonate qui permettent de préparer les tissus de l'hôte à une activation plus efficace des mécanismes de défense. Ce type de défense est peu coûteux en énergie par rapport à une activation constitutive des défenses de la plante et peut expliquer la présence largement répandue des CMA dans les systèmes racinaires ainsi que la conservation des ces microorganismes tout au long de l'évolution. Les communautés de microorganismes interagissent entre elles et ont donc des effets importants sur la biodiversité et le fonctionnement des écosystèmes [79].

Le degré d'amélioration de la croissance de la plante hôte dépend de nombreux facteurs comme la variété ou le cultivar de la plante hôte, l'espèce de champignon, les conditions du sol, etc. La dépendance mycorhizienne (MD) représente le degré de dépendance d'une plante à l'association avec des mycorhizes pour exprimer son potentiel de croissance ou de rendement maximal, à un niveau donné de fertilité du sol [32]. Cette valeur représente donc le degré de changement de croissance d'une plante dû à l'association avec des CMA. La MD moyenne de toutes les plantes analysées est de 56%. La MD varie selon l'espèce végétale, le cultivar, l'espèce de champignon, les conditions climatiques ainsi que celles du sol, le stade de développement de la plante, etc. Quand le phosphore est limitant dans le sol, la MD est positivement corrélée avec la dépendance de la plante pour cet élément. Harley (1989) [94] a estimé qu'il faudrait cent fois plus de biomasse racinaire pour produire une surface végétale équivalente par croissance de racines non colonisées que par croissance d'hyphes. Il serait donc très intéressant d'orienter la sélection génétique vers l'amélioration des associations plantes-CMA (colonisation racinaire élevée et MD élevée) afin de développer des variétés de plantes permettant une meilleure utilisation du phosphore du sol dans une optique de développement de systèmes durables à faible utilisation d'intrants.

Alors que le prélèvement supérieur de nutriments est considéré comme l'avantage principal apporté par les symbioses des plantes avec les CMA, ceux-ci permettent également de protéger les plantes contre les agressions de pathogènes, de réduire les stress dus à la toxicité de métaux lourds ou de la salinité, d'améliorer la structure du sol, ou encore d'optimiser l'efficacité d'utilisation de l'eau en diminuant la sensibilité à la sécheresse [8], [92]. Les CMA peuvent en effet augmenter la résistance des plantes contre les ravageurs et les maladies. Dans ce cadre, les CMA présentent un rôle potentiel dans l'application en champ dans des conditions spécifiques de pression de maladie. Sous des conditions de basse pression de maladie, il a été observé que les CMA permettent une réduction des symptômes sur plante. L'inoculation de cultures avec des CMA dans une approche intégrée permet donc de réduire la quantité ou la fréquence d'application de pesticides [1]. Hijri (2016) [44] a démontré que l'application à grande échelle d'inoculats mycorhiziens en agriculture est envisageable. L'inoculation de plantes cultivées avec des CMA constitue une approche révolutionnaire dans l'agriculture, en permettant l'amélioration des rendements des cultures et la réduction de l'application de fertilisants, en diminuant ainsi les impacts négatifs sur les équilibres chimiques de la planète terre. Il serait possible d'améliorer les inoculats mycorhiziens par la réalisation de synergies avec des bactéries ou d'autres endophytes, ou encore en produisant des inoculats adaptés à certaines conditions climatiques extrêmes. Il existe également des alternatives à l'inoculation comme l'application de composés synthétiques comme par exemple des flavonoïdes afin de stimuler la colonisation

racinaire par des communautés de CMA indigènes dans les sols cultivés. Toutes ces applications permettraient d'augmenter les rendements tout en contribuant à améliorer la sécurité alimentaire mondiale [44].

Les hyphes des CMA dans les sols jouent un rôle important sur la stabilité des agrégats et sur la rétention d'eau par leur sécrétion de polysaccharides et de glomaline, une glycoprotéine hydrophobe qui agit comme agent de cimentation pour les particules [33], [51], [111]. La présence d'hyphes dans le sol peut également favoriser de manière directe les agrégats en fournissant un squelette permettant l'assemblage physique des particules de sol [51]. Il a également été démontré que les CMA permettent d'augmenter la durabilité des écosystèmes en améliorant la structure du sol et en réduisant les pertes de nutriments dus au lessivage [101], [103]. La présence de CMA dans le sol a comme conséquence un enrichissement en carbone des zones voisines à la mycorrhizosphère. Sachant que la plupart des microorganismes vivant dans le sol dépendent des organismes autotrophes pour leur approvisionnement en carbone, la composition de la communauté de plantes détermine de manière critique la biomasse et la diversité des espèces microbiennes. La présence d'une communauté de CMA influence également de manière indirecte la composition des communautés microbiennes du sol par ses exsudations et la biomasse de mycélium mort [48]. La présence de CMA peut donc favoriser indirectement la stabilité des agrégats du sol en favorisant la présence de microorganismes dont les sécrétions pourraient avoir un effet positif sur l'agrégation des particules de sol [51].

Certains Gloméromycètes réalisent des symbioses avec des endobactéries [11]. Ces bactéries qui réalisent des symbioses avec les CMA peuvent coloniser la surface des hyphes extraracinaires mais peuvent également vivre dans le cytoplasme du champignon. Il existe deux types d'interactions : les bactéries se nourrissant de substrats dérivés des champignons et les champignons se nourrissant de bactéries. Il a été démontré par Bonfante *et al.* (2009) [10] que certains CMA peuvent se développer temporairement de manière indépendante à toute plante hôte s'il y a présence de bactéries. De plus, certaines bactéries stimulent le développement de la symbiose entre la plante et le CMA, grâce à la production de facteurs de croissance qui stimulent la germination des spores et la croissance du mycélium, qui diminuent la toxicité des sols, ou encore qui inhibent l'effet de compétition avec d'autres organismes. Il a été prouvé que certaines endobactéries se développant dans des CMA étaient des symbiotes obligatoires. Les endobactéries sont étudiées actuellement par les chercheurs, mais il est maintenant prouvé que les symbioses entre les bactéries et les CMA jouent un rôle essentiel dans les interactions existant entre les plantes hôtes et les CMA [10].

4.2 Impact de la gestion des agroécosystèmes sur les CMA : rôle des couverts végétaux et du labour

La culture de couverts végétaux représente une pratique importante dans la gestion des agroécosystèmes grâce aux effets positifs qu'ils produisent sur la santé de ces derniers. Ils contribuent à la conservation de la qualité des sols, au soutien de la performance des cultures suivantes, ils permettent de maintenir ou d'augmenter le potentiel mycorrhizien des sols, en donnant aux CMA l'accès à des nutriments (carbohydrates) pendant l'hiver, ceux-ci étant des mutualistes obligatoires. Les couverts végétaux colonisés par les CMA sont fondamentaux dans le processus de maintien d'un potentiel d'inoculum élevé pendant les périodes interculturelles. Sachant que les CMA sont des champignons biotrophes, la présence d'hôtes pendant la période

de jachère conditionne la viabilité des hyphes et du potentiel d'inoculum du sol [52]. Couplée à des conditions hivernales adverses, l'absence d'hôtes pour les CMA peut provoquer une diminution importante de l'inoculum présent dans un sol (jusqu'à 40%) [50]. Afin de maximiser les bénéfices apportés par les couverts végétaux à la culture suivante, il est essentiel de maintenir le potentiel d'inoculum mycorhizien tout au long de l'hiver. Les couverts végétaux mycotrophes survivant aux gelées hivernales permettent de jouer ce rôle. Alors que les couverts mycotrophes permettent une augmentation de l'absorption du phosphore et du rendement de la culture suivante, certains couverts non hôtes peuvent provoquer une réduction des propagules actives de CMA. Certains couverts végétaux (principalement de la famille des Brassicacées), ne sont pas mycorrhizés et peuvent avoir un effet de réduction de l'inoculum du sol et réduire la colonisation des racines de la culture suivante [70].

De nombreuses études démontrent le rôle essentiel joué par la composition des mélanges de couverts végétaux dans l'amélioration de la colonisation mycorhizienne de la culture suivante, ainsi que de l'activité mycorhizienne du sol [70]. Des expériences (Kabir et Koide, non publié) ont démontré que la colonisation racinaire, le contenu en phosphore, la biomasse aérienne, la hauteur et le rendement en grain des maïs plantés après un couvert végétal mycorhizien étaient bien supérieurs que chez des maïs plantés après un couvert végétal non mycorhizien. La gestion adaptée des pratiques culturales est donc essentielle afin de maintenir la communauté de CMA natifs d'un sol [50]. De plus, les pratiques culturales comme le travail du sol jouent un rôle essentiel sur la composition de la population mycorhizienne du sol agricole.

Bien que le but du labour consiste à mener la culture à son potentiel maximal de production, cette pratique a un impact négatif sur la survie des réseaux de la communauté mycorhizienne. Il peut également modifier l'importance de certaines espèces de champignons par rapport à d'autres. La diminution des pratiques de labour permet de conserver intactes les communautés de CMA et donc d'augmenter l'efficacité d'absorption du phosphore des plantes grâce à une meilleure colonisation racinaire, tout en diminuant l'érosion. En effet, si le réseau d'hyphes de CMA dans le sol n'est pas perturbé, la culture suivante réalisera une connexion plus rapide avec celui-ci et le coût de formation du réseau sera nul pour la nouvelle culture car il aura déjà été pris en charge par la culture précédente. La capacité d'absorption des nutriments du couvert végétal sera donc améliorée. De plus, sachant que les CMA sont plus abondants dans les 15 premiers centimètres du sol, le labour a un effet de dilution des propagules dans le sol. Cette pratique modifie également la distribution des nutriments dans le profil du sol, notamment celle du phosphore. Le fait de retourner le sol diminue la stabilité des agrégats du sol, en le rendant plus sensible à l'érosion par la pluie et le vent. Le labour provoque également une diminution de la diversité d'espèces de CMA, ainsi que la modification des quantités de chaque espèce présente dans un sol, en sélectionnant les CMA présentant certaines caractéristiques et en éliminant d'autres [66]. Le labour pourrait favoriser la présence d'espèces à croissance rapide qui pourrait être moins mutualiste et moins efficace pour l'amélioration de l'absorption des nutriments par la plante. Le genre *Glomus* est plus retrouvé dans les sols labourés. Le soin des choix des pratiques agricoles est important pour optimiser les bénéfices apportés par les CMA. Une gestion correcte des pratiques agricoles est donc essentielle afin de conserver une population de champignons mycorhiziens nombreuse et diversifiée [50].

Au vu des nombreux services apportés par les CMA, ceux-ci peuvent être utilisés comme des biofertilisants¹ dans les agroécosystèmes [33], grâce à leur capacité à augmenter la résistance des plantes aux stress biotiques et abiotiques [92] et à influencer la synthèse de métabolites secondaires par les plantes. Cependant, la possibilité d'accroître le potentiel de l'inoculum de CMA des sols par des pratiques culturales appropriées a été peu étudiée. Une telle stratégie est essentielle dans une approche d'agriculture durable en considérant la réduction des intrants qui s'appuie plus sur des approches agroécologiques que sur le recours à des intrants extérieurs. L'expression des services agroécosystémiques pourrait être améliorée selon deux approches différentes dans le but de promouvoir une colonisation efficace des cultures : d'une part par l'augmentation des souches indigènes de CMA ou d'autre part par l'introduction de souches sélectionnées [3].

4.3 Diversité de CMA versus diversité de plantes hôtes

Dans de nombreuses études, il a été observé que la diversité de la communauté mycorhizienne était supérieure sur des sols cultivés en agriculture biologique que sur des sols cultivés en agriculture conventionnelle [35], [66], [72], [103]. Ceci peut être expliqué par différents facteurs. L'agriculture biologique réalise des rotations plus longues, avec la présence de couverts végétaux contenant des légumineuses, qui favorisent le développement des CMA. Les systèmes d'agriculture biologique favorisent ainsi les CMA à long cycle de vie. Il est également important de rappeler que les effets bénéfiques des CMA diminuent avec la quantité de nutriments présents dans le sol : les CMA pourraient donc réduire la croissance des plantes à des hauts niveaux de fertilité dû à leur dépendance au carbone des plantes [92], [103]. L'agriculture conventionnelle aurait tendance à sélectionner une petite diversité de taxa de CMA généralistes [41], menant donc à des communautés de CMA plus homogènes.

Les CMA sont retrouvés dans les sols agricoles mais également dans les écosystèmes naturels. La diversité de CMA sur un champ cultivé est bien inférieure à celle rencontrée dans une forêt. Des changements saisonniers de diversité et de colonisation des cultures par les CMA ont été observés par Daniell *et al.* (2001) [21]. Les sols perturbés sont dominés par le genre *Glomus*. Le fait que *Glomus* soit dominant dans les systèmes perturbés peut être expliqué par des différences dans le type de propagules entre les différentes familles. Les Gigasporacées ne sont capables de se propager que par reproduction des spores ou par l'infection à partir d'un mycélium intact ; les Glomacées (dont le genre *Glomus* fait partie) sont capables de réaliser des colonisations à partir de morceaux de mycélium. De plus, *Glomus* présente la capacité de former des anastomoses². Alors qu'il est souvent dit que les CMA sont non ou peu spécifiques, les plantes hôtes pourraient, elles, présenter des préférences quant à la colonisation par certaines espèces ou souches spécifiques de CMA [21]. La dépendance mycorhizienne et la réactivité d'une plante dépend entre autres facteurs de son génotype [94]. L'amélioration génétique des espèces cultivées pourrait jouer sur ce facteur.

Les services écosystémiques apportés par les CMA peuvent être augmentés si la diversité de la communauté mycorhizienne est supérieure. Vu l'importance cruciale de la diversité de CMA pour le maintien du fonctionnement des écosystèmes, il devient nécessaire de comprendre les

1. Les biofertilisants représentent une alternative à la fertilisation chimique et sont utilisés dans l'agriculture durable dans le but d'augmenter la fertilité des sols et la production agricole grâce à l'action des microorganismes qu'ils contiennent [112].

2. Fusion d'hyphes permettant de connecter des fragments qui grandissent individuellement ou qui ont été séparés par une blessure mécanique [81].

mécanismes de régulation de la diversité des communautés de CMA. Les effets de la diversité mycorhizienne sur la communauté de plantes a attiré beaucoup l'attention des chercheurs ces dernières années alors que la question inverse, à savoir, quel est l'effet de la diversité de plantes sur la diversité de CMA et le fonctionnement de cette communauté a été fortement négligé. Ceci peut être expliqué par le fait suivant : comme seulement ~ 300 espèces de CMA ont été décrites jusqu'à présent [89], [105] et comme les symbioses sont présentes chez 99% des familles de plantes [15], il a été établi que la spécificité de ces champignons était très faible. Les CMA sont donc souvent considérés comme des organismes généralistes [55]. Ceci permettrait de conclure que la communauté de CMA est peu influencée par la communauté des espèces de plantes [48]. Cependant, des études ont démontré plus récemment que la composition des communautés de CMA trouvées dans les racines [102] et la production de spores [9] étaient influencées par les plantes hôtes.

Chapitre 5

Contexte et objectif de cette étude

Les CMA sont présents à l'état naturel chez la majorité des plantes terrestres (et sur les principales cultures) et jouent un rôle essentiel dans le développement des plantes et de leur résistance aux stress rencontrés tout au long de leur cycle de vie. Ils sont utilisés de manière croissante dans les agroécosystèmes pour leurs effets positifs sur les plantes, notamment sur les rendements. Apparus il y a plus de 450 millions d'années [91], les CMA ont très probablement permis aux premières plantes de coloniser le milieu terrestre. Ces champignons jouent un rôle important dans la nutrition des plantes et la conservation des sols. L'identification des combinaisons plante-champignon dont la performance mycorhizienne est optimale est essentielle afin de permettre la diminution de l'application massive d'intrants de synthèse, un objectif important à atteindre dans un monde où les ressources non renouvelables commencent à s'épuiser.

Les plantes hôtes et non hôtes ont une influence sur la composition de la communauté mycorhizienne. Il a été observé que la diversité d'espèces de CMA dans des racines de plantes cultivées en monoculture était inférieure à celle observée sur des racines prélevées d'écosystèmes semi-naturels riches en espèces végétales [21]. Basé sur le fait que la diversité de plantes influence la diversité de CMA [48], les monocultures à long terme ont un effet négatif sur la diversité mycorhizienne, bien qu'il soit difficile de séparer les effets directs des effets dûs à l'agriculture intensive comme l'application d'intrants et la perturbation des sols. De plus, il est prévisible qu'une communauté de CMA plus diversifiée offrira un ensemble de services écosystémiques plus diversifié [33].

La persistance des CMA dans un écosystème repose sur la survie et la multiplication des propagules, constituées par les racines de plantes colonisées, les hyphes des champignons et leurs spores. Les spores présentent une résistance qui leur permet de survivre en absence d'hôtes mais la principale source d'inoculum permettant la colonisation de nouvelles racines est constituée par les racines colonisées par ces champignons. Le recours à des couverts végétaux entre deux cultures principales permet de fournir des hôtes aux CMA pendant l'hiver et ainsi rendre possible leur survie jusqu'à la culture suivante [31]. Bien que les couverts végétaux soient largement utilisés en agriculture, peu de connaissances existent actuellement sur les impacts qu'ils ont sur les CMA natifs d'un sol. L'objectif de cette étude est donc d'analyser l'effet de la diversité d'espèces composant un couvert végétal sur la population mycorhizienne, au niveau de la densité de CMA dans le sol, de la colonisation racinaire des plantes hôtes et de la biodiversité de ces microorganismes.

Dans le cadre de cette étude, nous allons tester l'hypothèse selon laquelle la diversité d'es-

pèces de plantes a une influence sur la communauté de CMA. En particulier, nous allons comparer l'effet d'une monoculture de plantes non hôtes (moutarde), d'un sol nu, et de différents mélanges de plantes (composés de 2, 5 et 10 espèces) sur la diversité d'espèces de CMA. Nous avons émis l'hypothèse selon laquelle la diversité mycorhizienne serait plus faible dans la monoculture de moutarde et dans le sol nu car aucune colonisation n'est réalisée, et que celle-ci serait plus élevée en fonction du nombre d'espèces constituant le mélange, étant donné qu'une communauté de plantes plus diversifiée peut accueillir des champignons plus spécifiques.

Ici, nous avons émis l'hypothèse que l'augmentation de la diversité des espèces composant les différents mélanges de couverts végétaux fournirait un environnement plus favorable pour le développement des CMA. Les objectifs spécifiques de cette étude sont : (1) évaluer les effets de quatre couverts végétaux (différant dans la diversité d'espèces qui les composent) sur la densité de population des CMA dans le sol ; (2) mesurer l'impact de quatre couverts végétaux sur le taux de colonisation racinaire des plantes les constituant à maturité ; (3) analyser l'influence de la diversité d'espèces dans les couverts végétaux sur la biodiversité des CMA.

Deuxième partie

Matériel et méthodes

Chapitre 1

Contexte de l'étude

Cette étude a été réalisée en collaboration avec le Centre Alphonse de Marbaix de l'UCL, géré par Mr. Gérard Collignon, avec la Ferme des Noyers, dirigée par Mr. Nicolas Braibant, ainsi qu'avec Regenacterre, dirigée par Frédéric Muratori. Le Centre A. de Marbaix, inauguré en 1992, est une plateforme technologique et didactique mise à la disposition des chercheurs de l'UCL intéressés par l'alimentation animale et l'écologie agricole. Regenacterre est une Association Sans But Lucratif travaillant pour le développement et la promotion d'une agriculture régénérative en Belgique. Cette association offre un service de conseil indépendant à ses agriculteurs membres et réalise des expérimentations en conditions réelles afin d'explorer les innovations viables pour l'agriculture belge [84].

La caractérisation des mélanges de couverts végétaux a été réalisée en équipe, avec l'étude de différents aspects de ces derniers. En plus de l'analyse des CMA réalisée au cours de cette étude, trois autres mémoires ont approfondi les aspects suivants :

- l'analyse de la macrofaune et de la respirométrie du sol par Adeline Lefèvre ;
- l'étude du système racinaire de différents couverts végétaux par Diane Heymans ;
- la caractérisation physico-chimique de différents paramètres du sol par Denis Allard.

La parcelle avait été dédiée aux betteraves en 2016 ; en 2017, la culture précédant la mise en place des couverts végétaux dans le cadre de l'étude était de l'orge, type escourgeon. L'historique de la parcelle depuis août 2016 est décrit en Annexes, sur le Tableau V.2. Le semis des couverts a été réalisé le 20 juillet 2017 par Mr. Nicolas Braibant avec un semoir Horsch de quatre mètres de large. Aucun traitement n'a été appliqué sur la parcelle tout au long de l'expérience.

Chapitre 2

Plan expérimental

La parcelle expérimentale est située à Vieuxart, Belgique (latitude 50°40'56.0"N, longitude 4°38'12.1"E), sur les terres du Centre Alphonse de Marbaix de l'Université Catholique de Louvain (UCL). La parcelle se trouve dans la région agricole dite sablo-limoneuse, à proximité de la frontière avec la région limoneuse. Le champ sur lequel l'essai a été réalisé mesure 6,4 ha et la parcelle expérimentale mesure 0,85 ha. Cette dernière est entourée d'une zone tampon afin de séparer cette dernière de l'environnement extérieur au contexte de l'étude (Figure II.1).

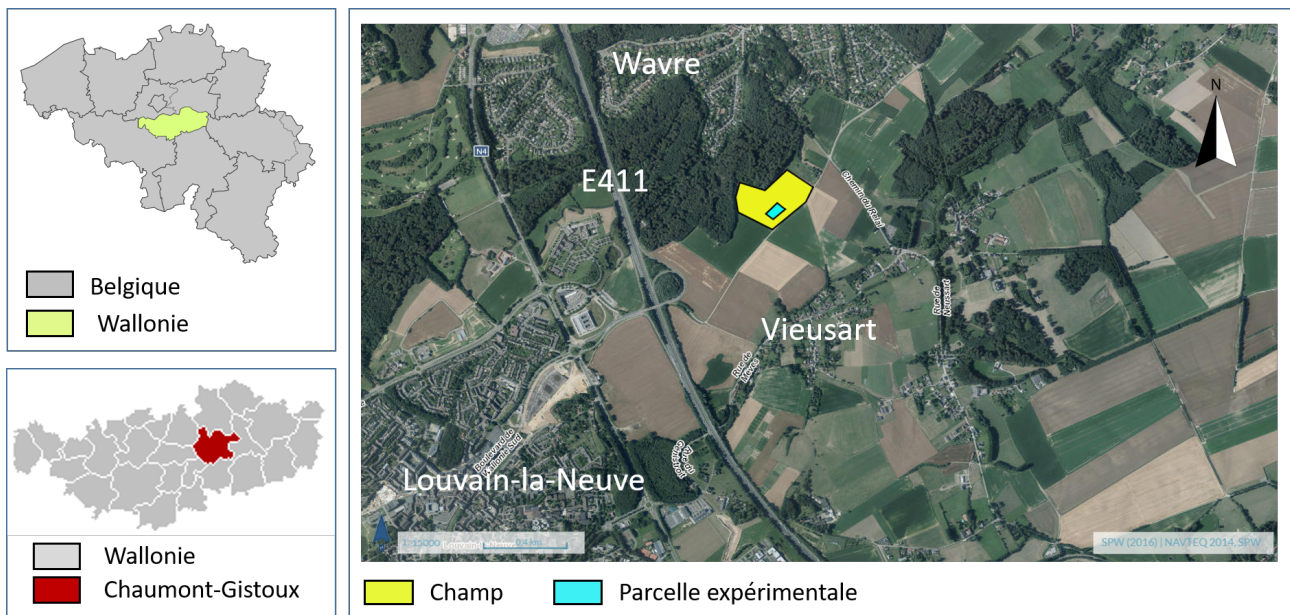


FIGURE II.1 – Localisation de la parcelle expérimentale. Échelle : 0,4 km. Auteur : Isaure Lohest.

La parcelle a été divisée en bandes dirigées du Nord-Est au Sud-Ouest, mesurant quatre mètres de large et 100 mètres de long. Les bandes "traitement" (en vert sur la Figure II.2, n° 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16) sont séparées les unes des autres par des bandes appelées "référence" (en blanc sur la Figure II.2, n° 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15). Toutes identiques, ces dernières sont constituées d'un mélange de deux espèces de couverts végétaux : l'avoine brésilienne (*Avena sativa*, 20 kg/ha) et le trèfle d'Alexandrie (*Trifolium alexandrinum*, 7 kg/ha). Une zone tampon, constituée du même mélange de deux espèces que les bandes "référence", est située entre le chemin et la première bande du champ afin d'éliminer les effets de bordure. Les différentes

bandes "traitement" ont été distribuées de manière aléatoire au sein du champ. Les couverts végétaux étudiés ont été les suivants, de la composition la plus simple à la plus complexe :

- "Zéro espèce" : un traitement ne contenant aucun couvert semé (n° 10) ;
- "1 espèce" : un couvert végétal constitué d'une espèce (n° 4, 16), la moutarde (*Sinapis alba*, 6 kg/ha) ;
- "2 espèces" : un couvert, considéré comme la référence, constitué par le mélange des deux espèces suivantes : l'avoine brésilienne (*Avena sativa*, 10 kg/ha), et le trèfle d'Alexandrie (*Trifolium repens*, 7 kg/ha) ;
- "5 espèces" : un mélange constitué de cinq espèces (n° 2, 14) : l'avoine brésilienne (*Avena sativa*, 10 kg/ha), le trèfle d'Alexandrie (*Trifolium repens*, 7 kg/ha), le lin (*Linum usitatissimum*, 1,5 kg/ha), la phacélie (*Phacelia tanacetifolia*, 2 kg/ha), et le tournesol (*Helianthus annuus*, 3 kg/ha) ;
- "10 espèces" : un couvert constitué de dix espèces (n° 6, 12) : l'avoine brésilienne (*Avena sativa*, 4 kg/ha), le trèfle d'Alexandrie (*Trifolium repens*, 2,5 kg/ha), le lin (*Linum usitatissimum*, 3 kg/ha), la phacélie (*Phacelia tanacetifolia*, 2 kg/ha), le tournesol (*Helianthus annuus*, 3 kg/ha), le nyger (*Guizotia abyssinica*, 1 kg/ha), le sarrasin (*Fagopyrum esculentum*, 2,5 kg/ha), le radis chinois (*Raphanus sativus*, 1 kg/ha), la vesce commune (*Vicia sativa*, 4 kg/ha), et la féverole (*Vicia faba*, 10 kg/ha).

Les traitements contenant 1, 2, 5 et 10 espèces ont été semés à deux densités : la densité standard ("Bandes densité 1", Figure II.2) et une densité supérieure (+33%) ("Bandes densité 2", Figure II.2). Une bande "référence" est intercalée entre chaque bande "traitement". Les mesures ont été répétées trois fois : elles ont été réalisées sur trois blocs ("Blocs" A, B, C, Figure II.2), perpendiculaires au sens des traitements. Au niveau de la terminologie utilisée dans ce mémoire, une microparcelle représente l'intersection entre une bande et un bloc ; 18 microparcelles (6 bandes * 3 blocs) ont donc été analysées pour les paramètres concernant les mycorhizes.

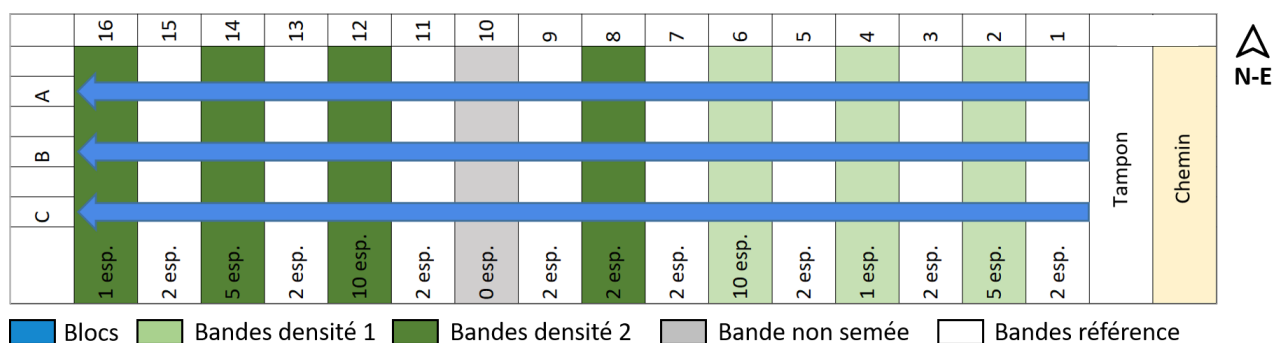


FIGURE II.2 – *Plan expérimental. Auteur : Isaure Lohest.*

Les espèces composant les différents mélanges de couverts végétaux ont été choisies par Mr. Frédéric Muratori sur base des informations de Thomas *et al.* (2013) [97]. Le couvert contenant seulement de la moutarde est semé communément en Belgique, il présente pour l'agriculteur l'avantage d'être économique. Le mélange de deux espèces (avoine brésilienne et trèfle d'Alexandrie, considéré dans cette étude comme la référence) représente un avantage du point de vue économique, mais également pour sa facilité d'implantation. Ces deux espèces représentent le

mélange de couverts végétaux utilisé habituellement par l'agriculteur Mr. Nicolas Braibant. Les mélanges contenant cinq et dix espèces sont constitués d'espèces de plantes complémentaires et de différentes familles. Ils permettront d'étudier l'influence de la diversité d'espèces composant le couvert végétal sur différents paramètres.

Le type de design expérimental rencontré ici présente deux caractéristiques permettant de prendre en compte la variabilité des observations non due aux traitements, causée par le caractère éventuellement hétérogène de la parcelle, lors de l'analyse des données. Premièrement, une référence unique a été intercalée entre chaque traitement différent. Cette référence est identique partout dans la parcelle et est constituée d'un mélange de deux espèces de plantes. Le fait de considérer ce mélange comme une référence permettra d'évaluer de manière quantitative les effets positifs ou négatifs d'autres traitements sur différents paramètres du système sol-plante par rapport à ce dernier. Deuxièmement, les observations sur chaque traitement ont été répétées trois fois, sur trois blocs (A, B et C, en bleu sur la Figure II.2) perpendiculaires au sens des traitements. La réalisation de trois répétitions pour chaque type de mesure sur chaque bande "traitement" permet de donner une validité statistique à ces dernières.

Le prélèvement d'échantillons sur les bandes "référence" permet d'évaluer le caractère homogène ou hétérogène de la parcelle dans le sens perpendiculaire à celui des bandes "traitement". En effet, la parcelle expérimentale est légèrement en pente vers le côté Nord-Ouest, autrement dit dans le sens d'un bloc (dans le sens allant de la bande n° 1 à 16). Cette variabilité sera prise en compte via une correction des données à analyser consistant à additionner à la valeur observée pour un traitement la différence entre la moyenne des observations réalisées sur toutes les références et l'observation réalisée sur la référence située à côté du traitement étudié (cfr Section 4.4, Formule 4.1). Cette correction des données permet d'observer si l'effet dû à un traitement est supérieur ou non par rapport à celui exercé par la référence sur les caractéristiques étudiées de l'écosystème. L'effet bloc peut être mis en évidence en analysant la variabilité des trois valeurs observées au sein d'une même bande.

La conduite des expériences en milieu agricole représente certaines contraintes liées au recours au matériel agricole qui sont à l'origine de ce design expérimental particulier. La mise en œuvre d'un dispositif expérimental composé de blocs aléatoires complets requiert la mise en place de petites parcelles adjacentes et différentes les unes des autres, ce qui n'est pas possible d'un point de vue technique dû à la nécessité d'utiliser des semoirs spécifiques.

Afin de limiter le volume d'expériences à réaliser, celles-ci étant souvent coûteuses en temps et en matériel, et afin de rendre possible leur réalisation, seules les bandes n° 1 à 6 seront étudiées au cours de ce mémoire, concernant les analyses spécifiques aux CMA.

Chapitre 3

Analyses réalisées

3.1 Analyse des caractéristiques des couverts végétaux

3.1.1 Biomasse aérienne

La biomasse des couverts végétaux sur les bandes n° 1 à 16 a été prélevée le 18 décembre 2017. Le prélèvement a été réalisé en coupant à l'aide d'une cisaille la biomasse aérienne sur une surface de deux m² pour chaque bande, sur chacun des trois blocs. Cette biomasse a été pesée. Ensuite, en transperçant le tas de biomasse récolté sur la surface de deux m² avec un tuyau en métal coupant d'un côté et contenant un ressort à l'intérieur, un petit échantillon cylindrique de biomasse a été prélevé. Le poids frais de ce petit échantillon a également été pesé. Après plusieurs semaines de séchage à l'étuve, le poids sec de ce petit échantillon a été pesé à nouveau. Cette dernière opération a été réalisée dans le but d'obtenir un coefficient en divisant le poids sec par le poids frais du petit échantillon. C'est en multipliant ce coefficient par le poids frais de la biomasse récoltée sur deux m² que le poids sec contenu dans la surface récoltée a été finalement obtenu. La biomasse aérienne est exprimée en T MS/ha (MS : Matière Sèche).

3.1.2 Biomasse racinaire

La biomasse racinaire a été mesurée le 4 décembre 2017 sur les bandes n° 1 à 6, sur les blocs A et B, à une profondeur de 15 cm. Cette mesure a été réalisée dans le cadre du mémoire de Diane Heymans intitulé : "Influence de la composition spécifique de couverts végétaux sur les paramètres physiques, chimiques et biologiques du système sol-plante : Étude des racines" [42]. Le protocole exact y est détaillé à la page 45. La biomasse racinaire, ou densité volumique de racines représente la masse de racines dans un volume de terre spécifique. La biomasse racinaire est exprimée en kg/m³.

3.1.3 Indice de surface verte

L'indice de surface verte, ou Green Area Index (GAI) est une mesure de la quantité totale de surface des parties aériennes des plantes (feuilles et tiges) par unité de surface de sol sur laquelle la mesure est réalisée. Le GAI est donc un indicateur sans dimension. La méthode utilisée ici pour la réalisation de cette mesure est destructive. Cette mesure a été effectuée une fois la couverture foliaire des couverts végétaux était totalement développée afin d'obtenir un aperçu le plus précis possible de la quantité de surface des plantes capable de réaliser de la photosynthèse.

L'indice de surface verte du couvert végétal a été mesuré plusieurs fois au cours du temps : le 11, le 18 et le 25 octobre 2017. Pour chaque date, l'échantillonnage a été réalisé sur tous les traitements (bandes n° 1 à 6) d'un seul bloc : respectivement le bloc A, puis le B, puis le C. Cet étalement dans le temps des mesures est dû à un problème pratique de gestion des quantités de biomasse à analyser. Cette analyse est en effet coûteuse en temps. Lors de l'analyse des données, le facteur temps ne sera pas considéré pour ces observations.

La biomasse aérienne a été récoltée à la cisaille sur une surface de un m² pour chaque bloc des différents traitements et la surface des plantes entières a été scannée au moyen d'un scanneur de surface à LED (LI-3100c Area Meter de la société LI-COR [62]). Les adventices n'ont pas été scannées. Cette méthode non destructive de scannage de la surface des plantes fournit des valeurs en cm². Pour obtenir une valeur de GAI à partir de la surface verte calculée par le scanneur, il suffit de diviser la valeur obtenue par la surface de sol pour laquelle la biomasse est scannée. Ici, les résultats lus sur le scanneur ont été divisés par 10 000 cm².

3.2 Analyse des caractéristiques du sol

3.2.1 Phosphore disponible

Le phosphore disponible, également appelé phosphore assimilable, représente le phosphore qui peut être prélevé par les végétaux. Le dosage du phosphore a été réalisé par la méthode d'Olsen [73]. Cette méthode permet de réaliser l'extraction du phosphore adsorbé à la surface des particules de sol. Les ions HCO_3^- , CO_3^{2-} et OH^- jouent un rôle de compétition ionique avec les phosphates adsorbés à la surface des particules du sol. Laatsch [60] a émis l'hypothèse que les ions HCO_3^- déplacent les phosphates adsorbés à la surface des particules colloïdales du sol.

Le dosage a été réalisé pour les bandes n° 1 à 6, sur les trois blocs, soit sur un total de 18 échantillons. Le prélèvement d'échantillons a été réalisé le 5 décembre 2017 à la tarière, sur une profondeur de 20 cm. Chaque échantillon provient du prélèvement de trois tarières de terre sur une surface de deux m² qui ont ensuite été mélangées. Après trois jours, le sol a été finement broyé. Le sol a ensuite séché pendant sept semaines à température ambiante (20 - 25°C).

L'extraction a été réalisée via une solution de NaHCO_3 0,5 M ajustée à un pH de 8,5 avec du NaOH 1 M. Pour chaque échantillon, un volume de 40 ml de cette solution a été ajouté à 2 g de sol. Après avoir agité 30 minutes, une centrifugation à 4 000 tours a été réalisée pendant 15 minutes. La solution a finalement été filtrée sur papier Whatman n° 41. Le phosphore a été quantifié par spectrométrie d'émission ICP AES sur ICAP 6 500 de Thermo Scientific. Le contenu en phosphore disponible du sol est exprimé en ppm ou en milligrammes de phosphore par kilogramme de sol sec (mg P/kg sol sec).

3.2.2 Activité biologique du sol

La mesure de l'activité biologique d'un sol est réalisée grâce au calcul de l'indice TBI (Tea Bag Index). Ce paramètre est évalué via deux indicateurs : le taux de décomposition (k) et le facteur de stabilisation de la litière (S), en mesurant la perte de poids de matériel végétal (ici le contenu de deux types de sachets de thé) enterré dans le sol due à la décomposition dans le temps [54]. Les sachets de thé utilisés sont du thé vert Lipton (EAN : 87 22700 05552 5) et du

thé au roiboos Lipton (EAN : 87 22700 18843 8).

Cette méthode, accessible à tous et dont la réalisation est simple et bon marché, permet de donner des informations relatives au cycle du carbone et ainsi d'aider à la modélisation du climat grâce à la participation de personnes du monde entier. La mise en place de la méthode de mesure de cet indicateur a été réalisée au sein d'une étude participative avec plusieurs universités. Cette initiative a été mise sur pied en 2010 par des chercheurs de l'Université d'Utrecht, de l'Université d'Umea, du Netherlands Institute of Ecology et de l'Austrian Agency for Health and Food Safety Ltd [95].

Les sachets de thé ont premièrement été pesés. Le 11 octobre 2017, ils ont ensuite été enterrés dans le sol à une profondeur d'environ huit centimètres, pour les traitements n° 1 à 6, sur les trois blocs. Un sachet de chaque type a été enterré dans chaque microparcelle, soit au total 18 sachets de thé vert et 18 sachets de roiboos. Après huit semaines, le 6 décembre 2017, les sachets de thé ont été déterrés. Après avoir séché 48 h à l'étuve à 70°C, les sachets ont été pesés. Finalement, le contenu des sachets a été incinéré à 550°C et pesé. Les facteurs k et S ont été calculés en utilisant les formules indiquées par Keuskamp *et al.* (2013) [54]. Les calculs ont été réalisés sur un fichier *Excel* téléchargeable et disponible en ligne (<http://www.teatime4science.org/data/submit-multiple-data-points/>).

3.3 Analyse des mycorhizes

3.3.1 Densité de propagules actives dans le sol

La méthode du nombre le plus probable (Most Probable Number ou MPN) permet l'estimation de la densité de population de microorganismes sans devoir passer obligatoirement par un comptage de chaque cellule individuelle ou de chaque colonie. Afin de connaître le potentiel mycorrhizogène d'un sol, ce test mesure le nombre de propagules actives dans le sol au niveau d'une plante piège. Ces plantes piège se développent dans des pots individuels de dilutions successives du sol contenant de l'inoculum. Après la réalisation de dilutions successives du milieu à analyser, la méthode consiste à déterminer la dilution limite dans laquelle il n'y aura plus de détection de propagules fongiques actives via l'analyse de la présence ou absence de CMA dans les racines des plantes piège [59].

Afin de réaliser une estimation précise de la densité de CMA dans le substrat étudié, à savoir le sol agricole, il est essentiel que l'inoculum de départ puisse se développer de manière correcte dans le milieu contenant les plantes pièges. Des conditions défavorables à la croissance des CMA comme un milieu de culture inadéquat ou la présence d'autres antagonistes peuvent mener à une sous-estimation de la densité de population réelle.

Sur base des théories de probabilité, il est possible de calculer le nombre le plus probable de microorganismes dans un substrat, en se basant sur :

- le nombre d'observations positives sur chaque plante piège ayant poussé dans l'inoculum ;
- le nombre de dilutions ;
- les facteurs de dilution de l'inoculum ;
- le volume d'inoculum présent dans chaque niveau de dilution ;
- le nombre de répétitions par niveau de dilution.

En combinant ces facteurs dans une équation, il est possible d'obtenir une valeur unique finale représentant le nombre le plus probable d'organismes présents dans l'inoculum de départ. Lors de la réalisation de ces calculs, plusieurs hypothèses sont émises : premièrement, que la distribution des propagules dans l'inoculum est homogène ; deuxièmement, que tout volume d'inoculum contenant au moins une propagule viable va montrer une croissance de cette dernière dans la plante piège. Si ces suppositions ne sont pas respectées, la valeur MPN peut sous-estimer la densité réelle de propagules actives dans le substrat analysé. Le nombre de microorganismes dans chaque échantillon suit une loi de Poisson [47].

Jarvis *et al.* (2010) [47] ont proposé un tableau *Excel* contenant un modèle permettant de calculer facilement les valeurs MPN avec leurs écart-types et leurs intervalles de confiance. La valeur MPN fournit une estimation de la densité μ de CMA dans le substrat (en propagules actives par g ou ml). La version du programme utilisée pour obtenir les résultats a été révisée en 2017. L'équation à résoudre afin de calculer la valeur MPN est la suivante :

$$\sum_{i=1}^k \left(\frac{x_i d_i w_i}{1 - e^{-d_i w_i \mu}} \right) - n_i d_i w_i = 0$$

où :

- i représente le nombre de dilutions réalisées pour chaque échantillon ;
- x_i représente le nombre d'observations positives pour chaque niveau de dilution observé ;
- d_i représente le facteur de dilution ;
- w_i représente le volume de sol dans lequel chaque plante piège s'est développé (60 g) ;
- μ représente la valeur MPN à estimer ;
- n_i représente le nombre de répétitions pour chaque niveau de dilution (3).

Méthode

L'échantillonnage a été réalisé au moyen d'une tarière sur l'horizon de surface contenant les 20 premiers centimètres de sol. L'analyse de la densité de mycorhizes a été réalisée deux fois au cours du temps. La première série d'échantillonnage a été réalisée avant le semis du couvert végétal (temps 0 : le 20 juillet 2017). Neuf prélèvements ont été réalisés sur la parcelle (Figure II.3). Ces neuf prélèvements ne correspondent pas à l'emplacement de bandes de couverts végétaux semés ultérieurement. Les prélèvements n° 1, 2 et 3 ont été mélangés pour former un échantillon ("échantillon 1"), idem pour les prélèvements n° 4, 5, 6 ("échantillon 2"), ainsi que pour les prélèvements n° 7, 8, 9 ("échantillon 3"). Trois échantillons ont donc été analysés au temps 0. La deuxième série de prélèvements a été réalisée quand le couvert végétal était arrivé à maturité (temps 1 : le 5 décembre 2017). L'essai MPN a été réalisé sur les mêmes échantillons de terre que ceux utilisés pour l'analyse du phosphore (Section 3.2.1) : les bandes n° 1 à 6 ont été analysées, en réalisant des prélèvements d'échantillons sur les trois blocs (A, B, C) pour chaque bande (Figure II.8). 18 échantillons ont donc été analysés pour l'essai MPN réalisé au temps 1.

La préparation des sols à analyser a consisté à laisser sécher ces derniers à température ambiante et à l'air libre (+/- 20°C et 40 - 50% HR) dans des bacs en plastique. Après avoir légèrement séché (trois jours), le sol a été émietté et broyé avec une bouteille en verre afin de faciliter le tamisage. La durée du séchage a été de sept semaines. Le tamisage du sol sec

7	4	1	Tampon	Chemin	Échantillon 1 Échantillon 2 Échantillon 3
8	5	2			
9	6	3			

FIGURE II.3 – *Échantillonnage MPN au temps 0. Les numéros de 1 à 9 représentent les prélèvements réalisés sur la parcelle expérimentale avant semis du couvert végétal. Auteur : Isaure Lohest.*

a ensuite été réalisé sur une grille de maillage de 0,5 cm. Un kilogramme de sol a été prélevé pour la réalisation de l'essai MPN : cette quantité de terre constitue l'inoculum pour chaque échantillon à analyser. Les semences de la plante piège (maïs) ont tout d'abord été disposées dans des boîtes de Pétri (diamètre de 9 cm) sur du papier Whatman humidifié à l'eau stérile pour permettre la prégermination. Les boîtes ont été placées dans une armoire à l'obscurité (20 - 25°C) pendant trois jours. Le matériel utilisé pour la réalisation de l'essai est détaillé en Annexes, Section 1.1.

18 plaques de culture de 33 puits (3 x 11) ont été utilisées. La mise en place de l'essai MPN a commencé au préalable par le collage d'une toile de nylon en dessous des puits dans lesquels les semences prégerminées des plantes piège seront semées, afin d'empêcher les racines et poils absorbants de sortir. Un papier Whatman a été placé au fond des puits afin d'éviter la perte de substrat. Chaque puits a été rempli avec 60 g de substrat sec (constitué d'inoculum et de sable stérile en différentes proportions, selon le niveau de dilution). Les échantillons de sol prélevés sur la parcelle constituent l'inoculum dont on veut déterminer la densité de propagules actives. Une semence de maïs prégermée a été placée dans chaque pot à un centimètre de profondeur (temps 0 : le 28 septembre 2017, temps 1 : le 9 février 2018).

Pour chacun des 18 échantillons de terre prélevés, dix niveaux de dilution ont été réalisés, chaque niveau de dilution a été répliqué trois fois. Pour les dix niveaux de dilution, le substrat utilisé est un mélange de terre séchée provenant de la parcelle (inoculum) et de sable stérile. Des témoins négatifs ne contenant pas d'inoculum (terre du champ) ont également été réalisés pour chaque échantillon. Ils ont également été répliqués trois fois ; le substrat utilisé est du sable stérile. 33 plantes piège ont donc été semées pour chacun des 18 échantillons de terre prélevés sur le champ : dix niveaux de dilution de l'inoculum et les témoins négatifs, chacun répliqué trois fois (3 x 11). Les 33 plantes piège de chacun des 18 échantillons ont été semées dans les puits d'une plaque de culture à 33 puits (Tableau II.1). Les dilutions réalisées sont détaillées sur les Tables II.2 et II.3. Les niveaux colorés en vert correspondent à des dilutions 4x par rapport au niveau précédent ; la couleur bleue représente les niveaux dilués 2x par rapport au niveau précédent.

Chaque plaque de culture a été placée dans un bac afin de faciliter l'arrosage par le bas tous les deux à trois jours. L'arrosage a été réalisé avec de l'eau déminéralisée pendant la première semaine, ensuite, celle-ci a été remplacée par une solution nutritive carencée en phosphore (Long Ashton) (Annexes, Tableau V.3). Les plantes se sont développées dans un phytotron pendant six semaines (conditions climatiques détaillées en Annexes, Section 1.1).

Les plantes de maïs ont été arrachées (temps 0 : après six semaines, le 9 novembre 2017, temps 1 : après huit semaines et cinq jours, le 11 avril 2018). Les racines ont ensuite été rincées

TABLEAU II.1 – *Plaque de culture à 33 puits utilisée dans l'analyse MPN. Disposition des répétitions (3) et des niveaux de dilution (dix plus un témoin négatif) dans une plaque de culture, pour un échantillon de terre de la parcelle. Temps 0 : trois plaques de culture, temps 1 : 18 plaques de culture. Auteur : Isaure Lohest.*

	Niveau de dilution										
Rep. 1	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	T-
Rep. 2	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	T-
Rep. 3	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	T-

TABLEAU II.2 – *Essai MPN au "temps 0" : quantités de substrat utilisées pour les différents niveaux de dilution. Auteur : Isaure Lohest.*

	Sable stérile (g)	Inoculum (g)	Sol pour dilution suivante (g)	Sol à éliminer (g)	Facteur de dilution	Inoculum total (g)
Témoin négatif	180	0	0	0	/	0
Niveau 1 (sol pur)	0	270	90	0	1	180
Niveau 2 (4 x)	270	90	90	90	0,25	45
...	...	...	...	...	...	...
Niveau 6 (1 024 x)	270	90	180	0	$9,76 \cdot 10^{-4}$	0,17
Niveau 7 (2 048 x)	180	180	180	0	$4,88 \cdot 10^{-4}$	0,088
...	...	...	...	...	...	...
Niveau 10 (16 384 x)	180	180	0	180	$6,10 \cdot 10^{-5}$	0,011

TABLEAU II.3 – *Essai MPN au "temps 1" : quantités de substrat utilisées pour les différents niveaux de dilution. Auteur : Isaure Lohest.*

	Sable stérile (g)	Inoculum (g)	Sol pour dilution suivante (g)	Sol à éliminer (g)	Facteur de dilution	Inoculum total (g)
Témoin négatif	180	0	0	0	/	0
Niveau 1 (sol pur)	0	270	90	0	1	180
Niveau 2 (4 x)	270	90	180	0	0,25	45
Niveau 3 (8 x)	180	180	180	0	0,125	22,5
...	...	...	...	...	...	...
Niveau 6 (64 x)	180	180	90	90	0,0156	2,81
Niveau 7 (256 x)	270	90	90	90	$3,91 \cdot 10^{-3}$	0,7
...	...	...	...	...	...	...
Niveau 10 (16 384 x)	270	90	0	180	$6,10 \cdot 10^{-5}$	0,011

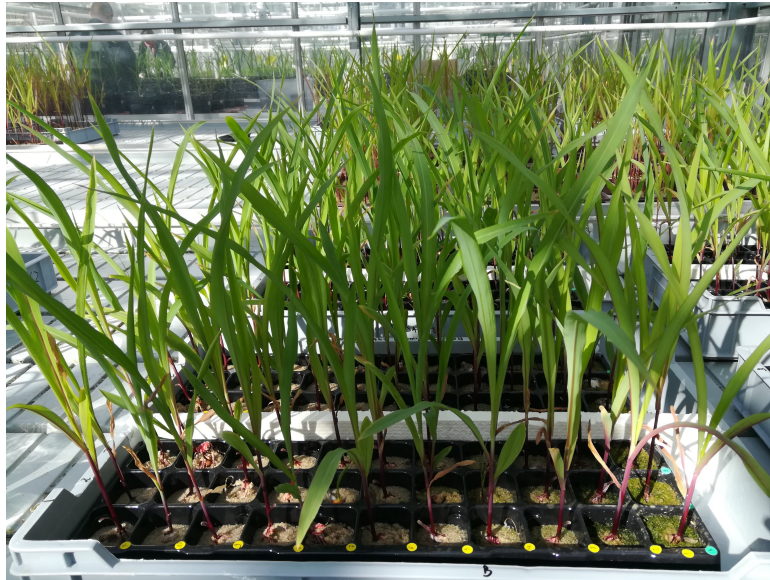


FIGURE II.4 – *Essai MPN : plaque de culture de 33 puits dans un bac. Photo : 14 mars 2018, Isaure Lohest.*

pour procéder à leur coloration. Les racines ont premièrement été plongées dans un bain de KOH 10% à 70°C pendant une heure. Ensuite, elles ont été rincées dans un bain d'HCl 1% pendant une minute pour finalement être plongées dans un bain d'encre 2% et d'HCl 1% chauffé à 70°C pendant une heure. Finalement, les racines ont été rincées à l'eau déminéralisée. Elles sont conservées dans des tubes contenant une solution de lactoglycérol (acide lactique : glycérol : eau, 1 : 1 : 1 en volume).

Les observations des racines ont été réalisées au binoculaire. L'observation de la présence d'une seule structure mycorhizienne est suffisante pour pouvoir considérer une plante comme positive (observation qualitative et non quantitative).

3.3.2 Taux de colonisation racinaire par les CMA

La méthode de McGonigle [68] permet de déterminer de manière visuelle la proportion de longueur de racine étant colonisée par des CMA. Le taux de colonisation racinaire représente le nombre de segments de racine présentant une colonisation par un CMA divisé par le nombre total de segments examinés. Cela revient au même que de calculer le nombre de champs de vision au microscope présentant une colonisation par le nombre de champs de vision examinés. Cette méthode présente dans la plupart des cas le désavantage de surestimer le pourcentage de colonisation, le degré de surestimation dépendant de la longueur des segments observés ainsi que de la longueur des régions colonisées.

La méthode d'observation consiste à noter la présence ou absence de colonisation sur l'intersection entre le segment de racine et la section verticale du champ de vision du microscope. Cette méthode présente comme principale difficulté que la décision de déterminer une intersection de racine comme colonisée ou non peut se faire sur l'observation d'hyphes et pas spécialement d'arbuscules. Sachant que l'arbuscule est la seule structure spécifique aux CMA, la décision consistant à classer un hyphe comme mycorhizien ou non peut varier d'un observateur à l'autre : elle dépend fortement de l'expérience de ce dernier.

Sur la Figure II.5, un cercle bleu représente le champ de vision du microscope et une ligne verticale en pointillés représente la section verticale du champ de vision du microscope : "A" correspond à une observation négative ; l'observation de "B" permet de remarquer la présence d'une spore ou d'une vésicule ainsi que d'hyphes, cependant, dans ce cas, seule la spore ou vésicule (selon le cas observé) est comptée et non les hyphes ; en "C", on peut observer des spores ou vésicules ainsi que des arbuscules et des hyphes, on note présence de spores ou vésicules ainsi que présence d'arbuscules, cependant la présence d'hyphes n'est pas considérée ; en "D", seulement des hyphes sont observés, leur présence est alors notée.

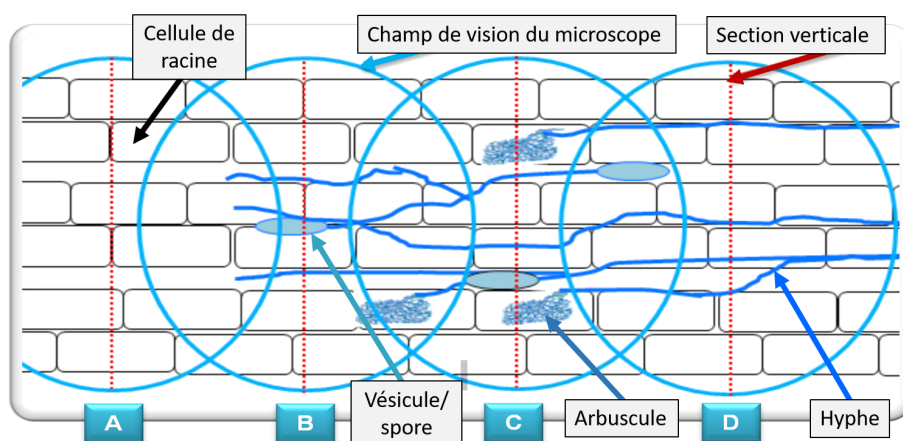


FIGURE II.5 – Méthode d'évaluation de la colonisation racinaire par des CMA selon le méthode de McGonigle et al. (1990) [14].

Méthode

Le prélèvement des échantillons a été réalisé le 5 décembre 2017. Des échantillons composites contenant un mélange représentatif des racines de toutes les espèces contenues dans chaque traitement ont été récoltés. Le prélèvement d'échantillons a été réalisé à la bêche, sur une profondeur de 20 cm. Les échantillons ont été prélevés sur les trois blocs des bandes n° 1 à 6 (18 microparcelles). Afin d'obtenir un aperçu représentatif de la diversité des espèces de plantes hôtes, cinq répétitions ont été réalisées sur chaque microparcelle ($18 \times 5 = 90$ échantillons).

Les racines, après avoir été lavées à l'eau, ont été colorées suivant la même méthode que celle réalisée pour la coloration des racines pour l'essai MPN (Section 3.3.1). Pour chaque échantillon, 40 fragments de radicelles mesurant 5 - 10 mm ont été placés entre lame et lamelle sur une goutte de glycérol afin d'éviter qu'ils ne sèchent (Figure II.6). L'observation des structures (hyphes, arbuscules, vésicules) a été réalisée au microscope optique au grossissement $\times 200$. Pour chaque lame, 200 observations (champs de vision) ont été réalisées.

3.3.3 Analyse moléculaire de la biodiversité de CMA

L'identification des espèces de l'ordre des Glomales a d'abord été basée sur la morphologie des spores des CMA. Il est possible actuellement, grâce à des outils moléculaires, d'identifier les CMA avec une résolution bien plus élevée. Ces méthodes ciblent une partie de l'ADN ribosomal. Des mélanges d'amorces spécifiques sont utilisés dans la réaction de PCR afin d'amplifier

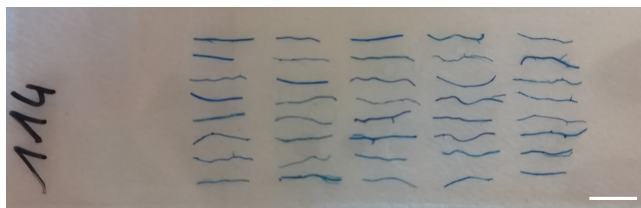


FIGURE II.6 – *Lame pour l'observation au microscope d'un échantillon selon la méthode McGonigle. Échelle : 5 mm. Photo : Isaure Lohest.*

des séquences spécifiques aux CMA, en discriminant ainsi l'ADN d'autres plantes et l'ADN de champignons non cibles [21], [58].

L'identification des souches ayant colonisé les racines des plantes constituant les différents couverts végétaux a été réalisée par la comparaison de séquences d'ADN ribosomal d'une longueur de 1,5 kb avec la banque de séquences d'ADN appartenant au Center for Biodiversity Information (NCBI).

Méthode

Les échantillons analysés ont été prélevés à la bêche sur la parcelle expérimentale le 5 décembre 2017, sur une profondeur de 20 cm. L'échantillonnage a été réalisé sur les bandes n° 1 à 6, sur les trois blocs (18 microparcelles). Afin d'obtenir un aperçu représentatif de la diversité des espèces de plantes hôtes constituant les différents couverts végétaux, cinq répétitions ont été réalisées sur chaque microparcelle ($18 \times 5 = 90$ échantillons en tout). Les échantillons sont les mêmes que ceux utilisés pour l'observation des taux de colonisation racinaire (Section 3.3.2).

La première étape a été le lavage des racines à l'eau. Une fois séchées, elles ont été conservées au congélateur à -20°C en attendant d'être broyées. Le broyage des racines a été réalisé à l'azote liquide, dans un mortier, et a permis d'obtenir une fine poussière de matériel végétal. Lors du broyage, les cinq répétitions de chaque microparcelle ont été mélangées afin d'homogénéiser le matériel (18 échantillons). Tout le matériel utilisé lors des manipulations a été préalablement désinfecté à l'éthanol et au *DNA away*, afin d'éliminer toute trace d'ADN contaminant.

L'extraction de l'ADN des CMA à partir des racines de plantes a ensuite été réalisée en utilisant le kit innuPREP Plant DNA. Le protocole est détaillé en Annexes, Section 1.2.1. Le produit des extractions a été quantifié ; le résultat est fourni en ng ADN/ μl .

L'ADN extrait a alors été amplifié par une réaction de PCR en deux étapes ou *Nested PCR*. Ce type de PCR est une modification de la PCR "classique" réalisée dans le but de réduire la quantité de produits non spécifiques résultant de la liaison des amorces à des sites non ciblés. Lors de la première PCR, l'ADN cible est amplifié de manière spécifique avec une première paire d'amorces, le rendement de cette amplification est faible. Une deuxième réaction PCR va alors être réalisée à partir des produits de la première PCR, en utilisant une seconde paire d'amorces, différente de la première. Les séquences de la seconde paire d'amorces se trouvent dans la région amplifiée lors de la première PCR. Cette deuxième amplification est moins spécifique mais son rendement est plus élevé. Elle a comme rôle d'amplifier des séquences qui ont précédemment été amplifiées spécifiquement. Il est très peu probable que les produits contenant des séquences non cibles contiennent les sites de liaison pour la seconde paire d'amorces.

La PCR1 (Annexes, Tableau V.5) a été réalisée en utilisant les amorces Af et Ar. Af et Ar sont un mélange de plusieurs amorces pouvant amplifier toutes les lignées de CMA (Annexes, Tableau V.9). Ces mélanges de différentes amorces sont réalisés afin de maximiser les chances d'amplifier une séquence spécifique aux CMA. Le produit de cette réaction est alors utilisé pour réaliser la PCR2 (Annexes, Tableau V.7). Le site de fixation des amorces utilisées, Cf et Br, est présent au sein de l'amplicon obtenu à l'issue de la PCR1. Les amorces Cf et Br sont également constituées d'un mélange de différentes amorces (Annexes, Tableau V.9).



FIGURE II.7 – Région de l'ADNr de *Glomus* sp. 'intraradices' (5' - 3') (5465 bp) ciblée par les amorces spécifiques aux CMA (Af, Ar, Cf, Br) [58].

Afin de s'assurer que l'amplification s'est bien produite, une électrophorèse sur gel d'agarose 1 % (Annexes, Section 1.2.3) à une intensité de 200 mA et un voltage de 100 V pendant 18 minutes a permis l'observation des produits de la PCR en deux étapes, grâce à un agent colorant d'acide nucléique (GelRed). Pour cela, 5 μ l d'ADN ont été mélangés à 5 μ l de Bleu de charge 1 x et chargés dans les puits du gel. La révélation du gel est faite aux rayons UV.

L'étape de clonage est réalisée dans le but d'obtenir un matériel en grande quantité et qui soit identique (un clone différent pour chaque microparcelle) pour l'étape de séquençage. Le clonage commence par la réaction de ligation qui permet d'insérer le produit de la PCR en deux étapes (PCR2) dans un plasmide (Annexes, Section 1.2.4). Le clonage a été réalisé en utilisant le kit de clonage Zero Blunt TOPO PCR. Une fois la ligation terminée, l'étape de transformation (Annexes, Section 1.2.4) permet d'insérer les plasmides dans les cellules de bactéries compétentes (*Escherichia coli*). Ensuite, après ajout de SOC (milieu de croissance) aux bactéries transformées, celles-ci ont été incubées à 37°C pendant trois heures afin de permettre leur multiplication.

Ensuite, la solution de bactéries transformées est étalée sur des boîtes de Pétri contenant un milieu discriminant de LB + Kanamycine (Annexes, Section 1.2.4). Chaque échantillon est étalé en conditions stériles sur deux boîtes avec respectivement 50 μ l et 100 μ l de bactéries transformées. Ces opérations sont réalisées dans un environnement stérile, à la flamme. L'étalement de deux volumes différents permet d'augmenter la probabilité de croissance de colonies bien isolées pour une souche. Les boîtes scellées sont mises en incubation à 37°C pendant 12 heures, en position inversée.

Les clones qui auront poussé sur les boîtes de Pétri sont ceux pour lesquels l'insertion du plasmide a bien été réalisée. Les clones ainsi obtenus pour chacun des 18 échantillons sont repiqués individuellement avec des embouts stériles et sont placés dans des tubes de 1,5 ml contenant 100 μ l de LB liquide et 1 μ l de Kanamycine 50 mg/ml. Ils sont laissés à température ambiante pendant deux heures et constituent la "solution de clonage".

La réalisation d'une PCR sur les clones (Annexes, Section 1.2.4) à partir de la solution de clonage permet de sélectionner les clones dont le plasmide contient bien la séquence d'ADN des CMA amplifiée lors de la PCR en deux étapes réalisée initialement. L'électrophorèse est réalisée de manière identique à celle réalisée pour les produits de la *Nested* PCR. L'étape de restriction enzymatique (Restriction Fragment Length Polymorphism ou RFLP) a ensuite été réalisée uniquement sur les échantillons positifs à cette dernière PCR. L'objectif de cette étape est de couper l'insert à différents endroits afin d'obtenir différents profils enzymatiques. Chaque profil enzymatique correspond potentiellement à une souche différente de CMA. Les différents profils présentent des variations dans la présence et la localisation des sites cibles de l'enzyme de restriction. Afin de maximiser les possibilités d'observer des profils enzymatiques différents, deux enzymes de restriction différentes ont été utilisées : *HinfI* et *RsaI* (Annexes, Section 1.2.4). La réaction dure une heure à 37°C.

Le produit de la réaction de restriction enzymatique est ensuite mis sur gel : aux 10 μ l de produit de la restriction sont ajoutés 2 μ l de loading dye 6 x. 6 μ l sont chargés dans les puits du gel. L'électrophorèse est réalisée sur gel d'agarose 1,5 %. Ce gel est plus dense que celui utilisé pour les migrations des produits PCR afin de permettre une meilleure séparation des bandes pour une lecture des profils plus aisée. La migration est réalisée pendant une heure à 100 V et 200 mA. La lecture des gels se fait aux UV.

Les échantillons à séquencer présentent chacun un profil de restriction enzymatique différent (105 profils différents observés). Les échantillons d'ADN (amplifiés lors de la PCR M13) correspondant aux profils enzymatiques sélectionnés ont été séquencés chez MacroGen Europe (Pays-Bas) (<https://dna.macrogen.com/eng/member/login.jsp>) (trois fois 15 μ l du produit de la PCR M13 sur clones pour chaque échantillon). Sachant que la taille de l'insert à séquencer est élevée (1,5 kb), trois amorces (M13f, M13r et ITS3) ont été utilisées. Les séquences obtenues à l'issue du séquençage ont été assemblées grâce au programme SEQUENCHER (Version 5.2.3, Gene Codes Corporation, Ann Arbor, MI, USA). Après correction des séquences, celles-ci ont été transformées en format *fasta*.

L'alignement des séquences nucléotidiques obtenues a été réalisé avec le programme MAFFT (Version 7, <https://mafft.cbrc.jp/alignment/server/> [53]), en utilisant des séquences de référence de CMA disponibles gratuitement (<http://www.amf-phylogeny.com/> [57]). Cet alignement a ensuite été téléchargé puis importé dans le programme PhyDE (Phylogenetic Data Editor, Version 1.8, <http://www.phyde.de/>). La séquence correspondant au segment amplifié pour le séquençage a été retrouvée en utilisant l'outil Find de PhyDE. Les séquences situées avant et après les amorces ont été supprimées. Les séquences importées ont ensuite été alignées manuellement. Après exportation au format *fasta*, ces séquences ont été importées sur la plateforme CIPRES Science Gateway (Version 3.3) en utilisant l'outil RAXML-HPC2 XSEDE (Version 8.2.9) [93]. 1 000 bootstrap ont été réalisés avec le modèle GTRGAMMA. Ceci a permis la réalisation d'un arbre phylogénétique de maximum de vraisemblance. Afin de faciliter la lecture de l'arbre, les branches ne portant pas de séquences détectées au cours de cette analyse ont été simplifiées jusqu'au niveau du genre ; cependant, la résolution jusqu'au niveau de l'espèce a été gardée autour des souches détectées lors de ce travail.

Chapitre 4

Méthodes d'analyse statistique

Les analyses statistiques ont été réalisées avec les logiciels *R* et *Excel*.

Une microparcelle représente le croisement d'un traitement (n° 1 à 6) et d'un bloc (A, B, C) : 18 microparcelles sont étudiées pour chaque analyse réalisée.

4.1 Moyennes et écarts-type

Les moyennes et les écart-types ont été calculés selon les formules suivantes :

$$\mu = \frac{\sum_{i=1}^n x_i}{n} \quad \text{et} \quad \sigma = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \mu)^2}{n}}$$

où :

- x_i représente la valeur observée ;
- n représente le nombre d'éléments observés ;
- μ représente la moyenne ;
- σ représente l'écart-type lié à la moyenne.

4.2 Analyse de la variance

Les valeurs observées sur chaque microparcelle d'un traitement ont été comparées via une analyse de la variance à un (ou deux) facteur(s) de classification, également appelé ANOVA 1 (ou 2), ainsi que par un test de Tukey.

La réalisation d'une ANOVA permet d'analyser via des test de Fisher si les moyennes obtenues pour chaque niveau d'un facteur donné (ici, le facteur correspond à la "bande traitement" étudiée, ou autrement dit le "couvert végétal" considéré) sont égales. Si les moyennes sont égales, cela signifie que le couvert végétal n'a pas d'influence sur le paramètre étudié. Les paramètres étudiés sont : la biomasse aérienne et racinaire, l'indice de surface verte (GAI), le phosphore disponible dans le sol, l'activité microbiologique du sol (TBI), la densité de propagules actives de CMA dans le sol et le taux de colonisation racinaire par les CMA.

Le modèle ANOVA 1 peut être représenté ainsi :

$$Y_{jk} = \mu_j + \epsilon_{jk} = \mu + \alpha_j + \epsilon_{jk}$$

avec

$$j = 1, \dots, m \quad k = 1, \dots, n_j$$

où :

- Y_{jk} est la variable quantitative étudiée ;
- j est le niveau du facteur étudié ;
- k est le numéro de la répétition ;
- μ_j est le résultat moyen attendu pour le niveau j du facteur étudié ;
- ϵ_{jk} est l'écart résiduel aléatoire entre l'observation k et la moyenne μ_j , avec $\epsilon_{jk} \sim iN(0, \sigma^2)$;
- μ est le résultat moyen attendu pour tous les traitements confondus ;
- α_j est l'effet du niveau j du facteur étudié, avec $\sum_i \alpha_i = 0$.

Le modèle ANOVA 2 peut être représenté ainsi :

$$Y_{ijk} = \mu_{ij} + \epsilon_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j + \gamma_{ij} + \epsilon_{ijk}$$

avec

$$i = 1, \dots, a; \quad j = 1, \dots, b; \quad k = 1, \dots, n_{ij}$$

où :

- Y_{ijk} est la variable quantitative étudiée ;
- i et j sont le niveau de chaque facteur étudié ;
- k est le numéro de la répétition ;
- μ_{ij} est le résultat moyen attendu pour le niveau i et j de chaque facteur étudié ;
- ϵ_{ijk} est l'écart résiduel aléatoire entre l'observation k et la moyenne μ_{ij} , avec $\epsilon_{ijk} \sim iN(0, \sigma^2)$;
- μ est le résultat moyen attendu pour tous les traitements confondus ;
- α_i et β_j sont l'effet du niveau i et j des facteurs étudiés, avec $\sum_i \alpha_i = 0$ et $\sum_j \beta_j = 0$;
- γ_{ij} est l'effet d'interaction entre les niveaux.

La réalisation d'une ANOVA implique la mise en place de trois hypothèses :

- l'indépendance des observations, assurée par le design et le contrôle des conditions expérimentales ;
- la normalité des résidus ;
- l'égalité des variances.

Pour toutes les variables analysées, seulement trois observations par bande ont été réalisées ; il n'est donc pas possible de tester la normalité des résidus. Lors de la réalisation des test d'ANOVA, l'hypothèse de normalité des résidus a donc été prise.

L'hypothèse H_0 testée par l'ANOVA est la suivante :

$$H_0 : \mu_1 = \mu_2 = \mu_3 = \dots = \mu_m = \mu$$

pour les différents niveaux de chaque facteur. L'ANOVA 2 teste en plus le terme d'interaction : $H_0 : \gamma_{ij} = 0$. Si la p-valeur obtenue à l'issue du test de Fisher est inférieure à 0,05, l'hypothèse H_0 est rejetée. Autrement dit, les moyennes ne sont pas égales, au moins une des moyennes testées est significativement différente des autres. Cependant, il n'est pas possible de déterminer quel est le niveau différant des autres.

Dans le cas de rejet de l'hypothèse H_0 , la réalisation d'un test de Tukey permet de déterminer quel est (sont) le(s) niveau(x) différant des autres. Ce test réalise des comparaisons multiples en comparant les moyennes de différents niveaux deux à deux. De nouveau, l'hypothèse H_0 testant l'égalité de deux moyennes est rejetée si la p-valeur est inférieure au seuil de 0,05. Le résultat du test de Tukey est classé en groupes de lettres : des lettres identiques signifient que les moyennes ne sont pas significativement différentes les unes des autres.

4.3 Relations entre variables

Afin d'observer si une variable pouvait être expliquée par une autre, des modèles linéaires simples ont été calculés. Le modèle linéaire simple peut être exprimé par la formule suivante :

$$Y_i = \beta_0 + \beta_1 X_i + \epsilon_i$$

où :

- Y_i est la variable à expliquer ;
- β_0 et β_1 sont les paramètres à estimer par la méthode des moindres carrés ;
- X_i est la variable explicative ;
- ϵ_i représente le terme d'erreur aléatoire, avec $\epsilon_i \sim iN(0, \sigma^2)$.

La méthode des moindres carrés va rechercher les valeurs des paramètres qui minimisent la somme des carrés des écarts entre la droite du modèle estimé et les observations.

L'hypothèse testée dans la régression linéaire simple permet de tester la signification du modèle :

$$H_0 : \beta_1 = 0.$$

De plus, l'observation du R^2 (coefficient de détermination) permet de mesurer le pourcentage de la variance de la réponse (Y) expliquée par la variable explicative (X).

4.4 Correction des données

Le design expérimental de la parcelle a été conçu afin de pouvoir tenir en compte de l'hétérogénéité de la parcelle lors de l'analyse des données. Le fait d'avoir séparé chaque bande

"traitement" (en vert ou gris sur la Figure II.8) par une bande "référence" (en blanc sur la Figure II.8), constituée d'un mélange de deux espèces identiques sur toute la parcelle, permet de tenir compte de la part de la variabilité des paramètres observés non due à l'effet du traitement, dans le sens perpendiculaire à celui des bandes. De plus, trois répétitions (blocs A, B, C) (en bleu sur la Figure II.8) ont été réalisées pour chaque mesure réalisée sur une bande, permettant ainsi d'observer également la variabilité au sein même d'une bande et par conséquent non due à l'effet traitement.

La correction des données a été appliquée sur les observations des bandes "traitement" (n° 2, 4, 6). La formule utilisée est :

$$Y_{ij \text{ Corr}} = Y_{ij} + (\mu - Y_{i(j-1)}) \quad (4.1)$$

où :

- i indique le bloc, avec $i = A, B, C$;
- j indique la bande, avec $j = 1, \dots, 6$;
- $Y_{ij \text{ Corr}}$ représente la valeur corrigée pour l'observation réalisée sur la bande "traitement" j (n° 2, 4, 6) du bloc i ;
- Y_{ij} représente la valeur observée sur la bande "traitement" j (n° 2, 4, 6) du bloc i ;
- μ représente la moyenne de toutes les valeurs observées sur les bandes "référence" (n° 1, 3, 5) pour les blocs A, B et C ;
- $Y_{i(j-1)}$ représente la valeur observée sur la bande "référence" $j - 1$ (n° 1, 3, 5) située à côté de la bande "traitement" ij observée.

Cette correction des données permet par conséquent de tenir compte de l'éventuel effet bloc grâce au terme μ . Les valeurs corrigées représentent donc l'effet d'un traitement en tenant compte de la bande référence avoisinante.

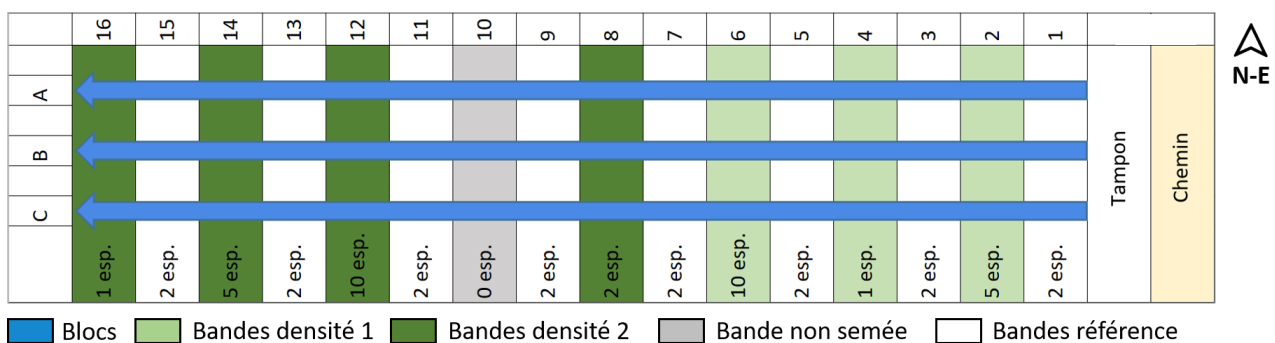


FIGURE II.8 – *Plan expérimental. Auteur : Isaure Lohest.*

Troisième partie

Résultats

Chapitre 1

Biomasse aérienne et racinaire

La biomasse est une variable quantitative qui peut être expliquée par deux facteurs catégoriels : le *traitement* (différents nombres d'espèces constituant le couvert végétal) et la *densité* (deux densités de semis pour chaque traitement).

1.1 Biomasse aérienne

La réalisation d'une ANOVA 2 pour la biomasse aérienne montre qu'il n'est pas possible de prouver qu'il n'y a pas d'interaction entre ces deux facteurs ($p\text{-valeur} > 0,05$), le facteur *traitement* est significatif, alors que le facteur *densité* ne l'est pas (Tableaux III.1 et III.2). Pour le reste des analyses, seulement la biomasse des traitements de la densité 1 sera donc analysée.

Sur la Figure III.1, les points représentent les valeurs corrigées et la barre horizontale représente la valeur de la moyenne des points. Il en est de même pour tous les graphiques représentés par la suite. Le traitement "2 espèces" à la densité 1 (entouré en rouge sur la Figure III.1) constitue la référence (R), le point représente dans ce cas la moyenne μ des valeurs observées sur toutes les bandes "référence" ; le traitement "zéro espèces" représente la bande (n° 10) sur laquelle aucun semis n'a été réalisé et ne contient que des repousses de la culture précédente (escourgeon). Le traitement "1 espèce" est celui pour lequel la biomasse du couvert végétal est la plus faible.

La réalisation d'une ANOVA 1 de la biomasse avec comme facteur le *traitement* pour la densité 1 montre qu'il y a des différences entre les traitements ($p\text{-valeur} < 0,001$). Les biomasses des traitements "0, 1 et 2 espèces" ne sont pas significativement différentes entre elles ; il en est de même pour les biomasses des traitements "2, 5 et 10 espèces". Les traitements "0 et 1 espèce" sont significativement différents des traitements "5 et 10 espèces" (Tableau III.1).

TABLEAU III.1 – *Moyennes et écarts-type des valeurs corrigées de la biomasse aérienne [T MS/ha] pour tous les traitements. La colonne "Groupe" représente le résultat d'un test de comparaison des moyennes pour les observations de la "densité 1".*

Traitement	Densité	Moyenne	Écart-type	Groupe
0 espèce	-	1,725	1,779	B
1 espèce	1	1,628	0,177	B
	2	2,0431	0,685	-
2 espèces (R)	1	4,0428	0,218	AB
	2	5,151	0,607	-
5 espèces	1	3,890	0,518	A
	2	5,121	1,0882	-
10 espèces	1	4,793	0,933	A
	2	4,111	0,866	-

TABLEAU III.2 – *Moyennes et écarts-type des valeurs corrigées de la biomasse aérienne [T MS/ha] pour chaque densité. La colonne "Groupe" représente le résultat d'un test de comparaison des moyennes.*

Densité	Moyenne	Écart-type	Groupe
1	3,0883	1,514	A
2	4,0144	1,496	A

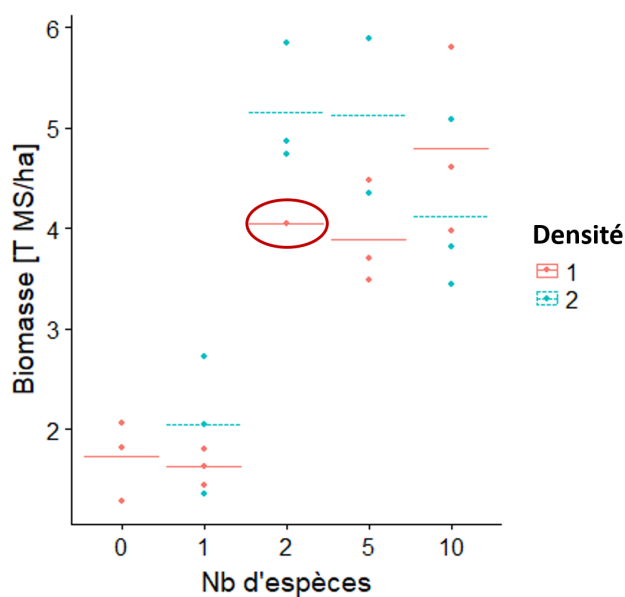


FIGURE III.1 – *Valeurs corrigées et moyennes de la biomasse aérienne des couverts végétaux.*

La régression linéaire de la biomasse en fonction du nombre d'espèces composant le couvert montre que 74% de la variabilité de la biomasse aérienne est expliquée par le nombre d'espèces composant le couvert végétal (p -valeur = 0,000157) (Figure III.2).

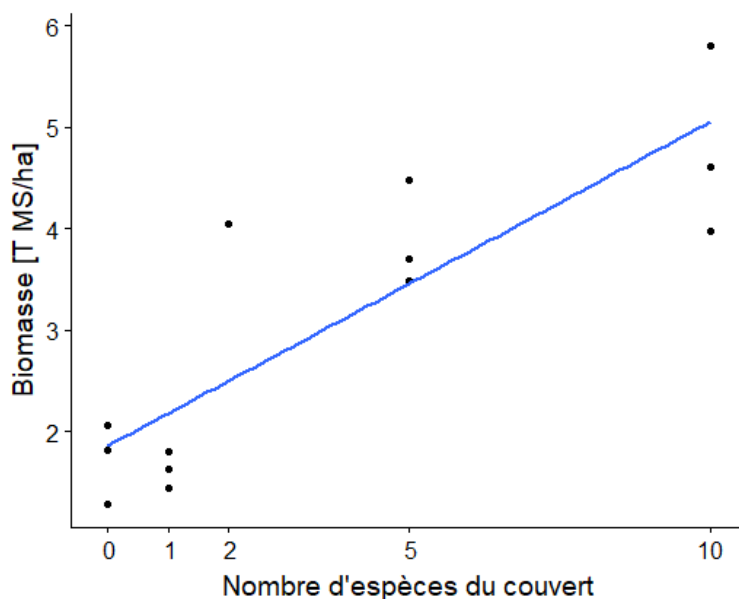


FIGURE III.2 – *Régression linéaire de la biomasse aérienne en fonction du nombre d'espèces composant le couvert végétal. L'équation de la droite est : $\hat{y} = 0,31990 x + 1,85796$, $R^2 = 0,7413$.*

1.2 Biomasse racinaire

Concernant la biomasse racinaire, seulement les blocs A et B des bandes n° 1 à 6 (densité 1) ont été analysés, pour des raisons pratiques concernant le temps nécessaire pour le prélèvement et le traitement des échantillons. La réalisation d'une ANOVA 1 en prenant le *traitement* comme facteur, montre qu'il n'y a pas de différences significatives entre les différents couverts végétaux (p -valeur = 0,388). De plus, la réalisation d'une comparaison des moyennes confirme ce résultat, tous les traitements appartiennent au groupe "A". Des écarts-type élevés sont observables, ce qui peut être dû au fait que seulement deux répétitions ont été réalisées pour ces données (Tableau III.3). Il a été démontré dans le mémoire de D. Heymans [42] qu'en moyenne, 75% de la biomasse racinaire se trouve au-dessus de 30 cm dans le profil vertical du sol. Les prélèvements d'échantillons utilisés pour la caractérisation des mycorhizes ont été réalisés sur les 20 premiers centimètres de sol. Nous avons donc considéré que les échantillons de terre contenant de la biomasse racinaire de couverts végétaux et prélevés pour la caractérisation des mycorhizes étaient représentatifs des interactions existant entre ces champignons et leurs plantes hôtes.

TABLEAU III.3 – *Moyennes et écarts-type des valeurs corrigées de la densité de biomasse racinaire [kg/m³]. La colonne "Groupe" représente le résultat d'un test de comparaison des moyennes.*

Traitement	Moyenne	Écart-type	Groupe
1 espèce	0,705	0,178	A
2 espèces (R)	1,809	1,152	A
5 espèces	1,297	0,368	A
10 espèces	0,984	0,482	A

Chapitre 2

Indice de surface verte

L'indice de surface verte (GAI) est une variable quantitative expliquée par une variable catégorielle, le *traitement*.

L'observation de la Figure III.3 permet de remarquer la présence d'un point aberrant pour le traitement "5 espèces" ; en effet, l'écart-type pour ce traitement est plus élevé que la valeur moyenne (Tableau III.4). Il ne convient pas de le considérer dans l'analyse statistique. La faible valeur de cette observation peut être due à plusieurs raisons : premièrement, une hétérogénéité des échantillons prélevés sur la parcelle due à des conditions localement moins favorables au développement des plantes ; deuxièmement, une erreur de mesure de la surface verte provoquée par le scanneur de surface à LED. Cette dernière hypothèse semble être la cause la plus probable. En supprimant cette valeur erronée, la moyenne de l'indice de surface verte du traitement "5 espèces" vaut 4,737 et l'écart-type 0,582 ; ces valeurs semblent plus cohérentes. La réalisation d'une ANOVA 1 avec le facteur *traitement* (sans tenir du point entouré en rouge, Figure III.3) présente alors une p-valeur de 0,00802 : le traitement "1 espèce" est significativement différent des autres traitements.

TABLEAU III.4 – *Moyennes et écarts-type des valeurs corrigées de l'indice de surface verte. La colonne "Groupe" représente le résultat d'un test de comparaison des moyennes.*

Traitement	Moyenne	Écart-type	Groupe
1 espèce	1,181	0,706	A
2 espèces (R)	4,674	1,630	A
5 espèces	2,523	3,856	A
10 espèces	4,119	0,563	A

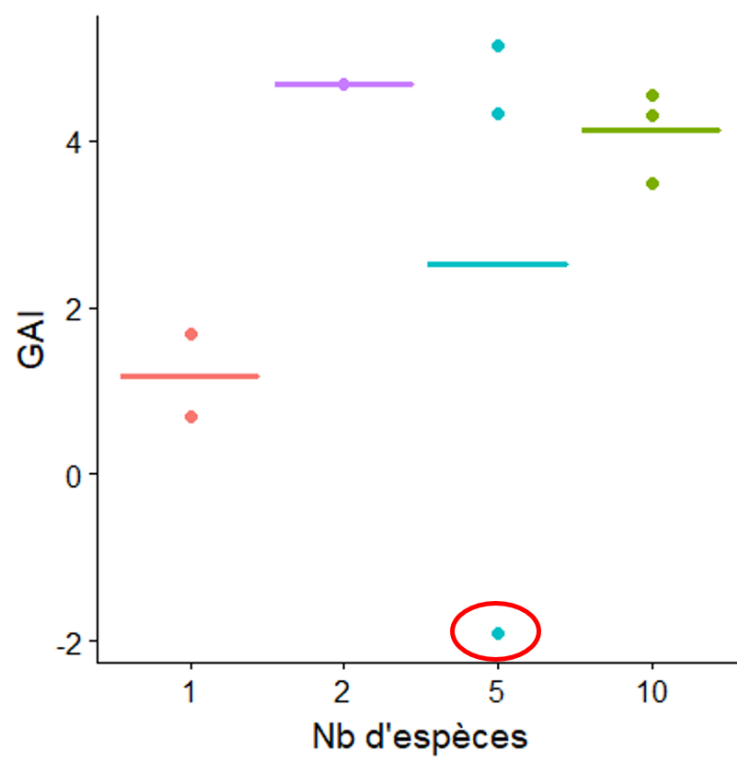


FIGURE III.3 – Valeurs corrigées et moyennes de l'indice de surface verte des couverts végétaux.

Chapitre 3

Phosphore disponible

Le phosphore disponible est une variable quantitative expliquée par une variable catégorielle, le *traitement*.

La réalisation d'une ANOVA 1 sur les données corrigées montre qu'il n'y a pas de différences significatives de la teneur en phosphore dans les différentes bandes de la parcelle en date du 5 décembre 2017 (p -valeur = 0,501). Le test de Tukey confirme cette conclusion : tous les traitements appartiennent au groupe "A", aucune moyenne n'est donc significativement différente des autres. Le contenu en phosphore disponible peut donc être considéré comme homogène dans l'ensemble de la parcelle. La teneur en phosphore ne pourra donc pas permettre d'expliquer d'autres variables.

TABLEAU III.5 – *Moyennes et écarts-type des valeurs corrigées des quantités de phosphore disponible dans le sol [mg P/kg sol sec]. La colonne "Groupe" représente le résultat d'un test de comparaison des moyennes.*

Traitement	Moyenne	Écart-type	Groupe
1 espèce	72,404	9,0164	A
2 espèces (R)	59,461	6,169	A
5 espèces	55,485	13,0803	A
10 espèces	52,461	16,388	A

Chapitre 4

Activité biologique du sol

La mesure de l'activité biologique du sol par le test "Tea Bag" est une variable quantitative expliquée par une variable catégorielle, le *traitement*.

La réalisation d'une ANOVA 1 montre qu'il n'y a pas de différences significatives entre les valeurs du taux de décomposition k pour les différents traitements dans la parcelle (p -valeur = 0,394). Le test de Tukey de comparaison des moyennes montre également qu'aucune bande n'est significativement différente des autres (Tableau III.5). Ces observations ne pourront donc pas permettre d'expliquer d'autres variables.

TABLEAU III.6 – *Moyennes et écarts-type des valeurs corrigées des mesures du taux de décomposition de la matière organique k . La colonne "Groupe" représente le résultat d'un test de comparaison des moyennes.*

Traitement	Moyenne	Écart-type	Groupe
1 espèce	0,0274	0,00502	A
2 espèces (R)	0,0294	0,00467	A
5 espèces	0,0249	0,00141	A
10 espèces	0,0273	0,00288	A

Chapitre 5

Densité de propagules actives dans le sol

Le modèle de Jarvis *et al.* [47] a permis de calculer la valeur MPN, ou valeur estimée de la densité de propagules actives dans le sol pour les bandes n° 1 à 6, pour les trois blocs (A, B et C). Le modèle permet également d'obtenir les intervalles de confiance des valeurs MPN.

La valeur MPN au "temps 0" (avant mise en place des couverts végétaux) est une variable quantitative expliquée par un facteur catégoriel, la *position dans la parcelle*. La réalisation d'une ANOVA 1 pour les trois valeurs MPN permet de conclure que celles-ci ne sont pas significativement différentes les unes des autres (p-valeur = 0,333) (Tableau III.7). La densité de propagules actives de CMA dans le sol avant la culture des couverts végétaux peut être considérée comme distribuée de manière homogène au sein de la parcelle.

Après correction des données, la réalisation d'une ANOVA 1 avec comme facteur explicatif le *traitement*, pour le jeu de données obtenu au "temps 1", donne une p-valeur de 0,246. Il n'est donc pas possible de prouver qu'il y a de différences significatives entre les traitements. Le test de Tukey de comparaison des moyennes montre également qu'aucune moyenne n'est significativement différente des autres (Tableau III.7).

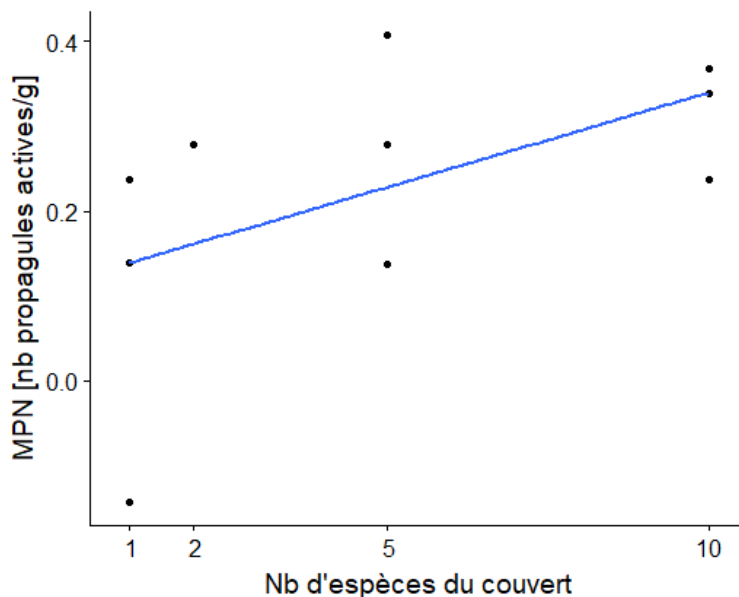
TABLEAU III.7 – *Moyennes et écarts-type des valeurs corrigées des mesures MPN [nombre de propagules actives/g]. La colonne "Groupe" représente le résultat d'un test de comparaison des moyennes.*

Temps	Traitement	Moyenne	Écart-type	Groupes				
0	-	0,109	0,0266	-	B	C	D	E
1	1 espèce	0,0784	0,197	A	B	-	-	-
1	2 espèces (R)	0,278	0,138	A	-	C	-	-
1	5 espèces	0,274	0,135	A	-	-	D	-
1	10 espèces	0,314	0,0681	A	-	-	-	F

Bien que les différences ne soient pas significatives entre les différents traitements au "temps 1", l'observation de la Figure III.4 de la régression linéaire de la valeur MPN en fonction du nombre d'espèces retrouvé dans les différents traitements permet de remarquer que le nombre d'espèces composant le couvert végétal est légèrement corrélé de manière positive à la valeur MPN. Cependant, la p-valeur de la régression vaut 0,1045, ce qui ne permet pas d'affirmer que la pente de ce modèle est différente de zéro, autrement dit, que le nombre d'espèces du couvert végétal explique la valeur de la densité de propagules actives dans un sol. Ceci confirme le résultat obtenu par l'ANOVA 1. La valeur MPN négative observable pour le traitement "une

espèce" est due à la correction des données des bandes "traitement" par rapport aux bandes "référence" (Formule 4.1).

FIGURE III.4 – Régression linéaire de la densité de propagules de CMA actives dans le sol en fonction du nombre d'espèces végétales du couvert au "temps 1". L'équation de la droite est : $\hat{y} = 0,02229 x + 0,11654$, $R^2 = 0,2953$.

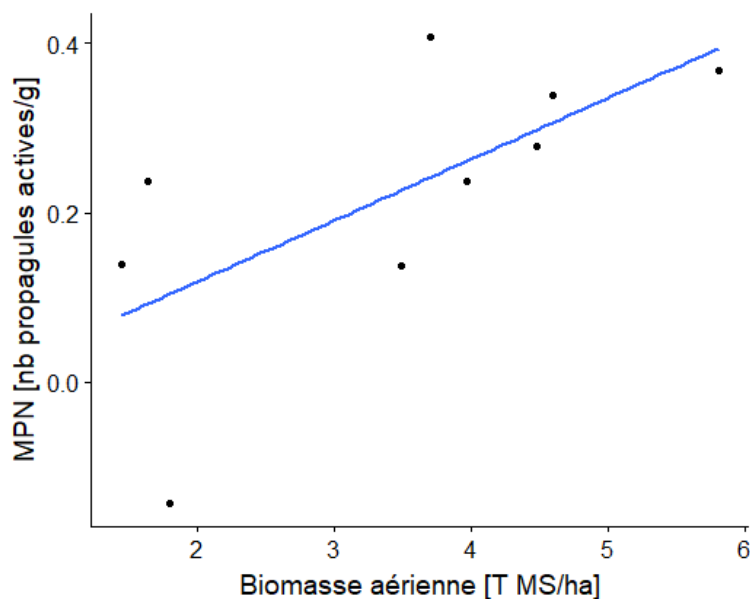


Les valeurs MPN peuvent également être expliquées par le facteur catégoriel *temps*. Une ANOVA 1 a été réalisée pour chaque traitement. Les valeurs MPN obtenues au "temps 0" ont été comparées aux valeurs obtenues pour chaque traitement (1, 2, 5 et 10 espèces). Aucune influence du facteur *temps* n'a été observée pour les traitements "1 espèce" (p-valeur = 0,801), "2 espèces" (p-valeur = 0,107) et "5 espèces" (p-valeur = 0,106). Cependant, pour le traitement "10 espèces", la p-valeur vaut 0,00827. La p-valeur étant inférieure au seuil de 0,05, on peut considérer que le temps a eu une influence positive significative sur le développement des propagules actives dans le sol. La réalisation d'un test de Tukey de comparaison des moyennes montre également que les moyennes sont significativement différentes au "temps 0" et au "temps 1" pour le traitement "10 espèces" (Tableau III.7).

La densité de propagules actives dans le sol peut être analysée en utilisant comme variable explicative les caractéristiques des couverts végétaux : la *biomasse aérienne* et *racinaire*, ainsi que l'*indice de surface verte*. Ce sont des variables quantitatives. La régression linéaire de la Figure III.5 montre que la densité de propagules actives dans le sol est significativement influencée par la biomasse aérienne (p-valeur = 0,001768). 44% de la variabilité de la valeur MPN est expliquée par la biomasse aérienne. La régression linéaire de la valeur MPN en fonction de la biomasse racinaire des couverts végétaux montre qu'il n'y a pas d'influence significative (p-valeur = 0,07039). Pour cette dernière analyse, seulement les blocs A et B ont été comparés. L'indice de surface verte ne permet pas non plus d'expliquer la variabilité de la densité de propagules actives (p-valeur = 0,4174) (Chapitre 2).

Finalement, il est également possible d'étudier la variable quantitative densité de propagules en fonction des caractéristiques chimiques et biologiques du sol. Les caractéristiques du sol étudiées sont des variables quantitatives : le *phosphore disponible* et l'*indice d'activité mi-*

FIGURE III.5 – *Régression linéaire de la densité de propagules de CMA actives dans le sol en fonction de la biomasse aérienne. L'équation de la droite est : $\hat{y} = 0,07231 x - 0,02607$, $R^2 = 0,4361$.*



crobiologique. Cependant, les teneurs en phosphore n'étant pas significativement différentes au sein des différentes bandes de la parcelle (p-valeur de la régression linéaire = 0,6575) (Chapitre 3), cette mesure ne pourra pas être utilisée comme variable explicative. Les mêmes conclusions peuvent être tirées concernant l'indice d'activité microbologique du sol (p-valeur de la régression linéaire = 0,4896) (Chapitre 4).

Chapitre 6

Taux de colonisation racinaire par les CMA

Le taux de colonisation racinaire des couverts végétaux est une variable quantitative expliquée par le facteur catégoriel *traitement*.

La Figure III.6 présente la distribution des données de colonisation racinaire. Ce graphique représente la fonction de densité de probabilité d'observer une valeur de RC%. L'observation de la distribution des valeurs corrigées de pourcentage de colonisation racinaire sur la Figure III.6 révèle que les taux de colonisation du traitement "1 espèce" (moutarde) sont proches de zéro, et que la distribution des observations est dense autour de cette valeur ; leur variance est plus faible que celle des autres traitements. Les valeurs négatives sont issues de la correction des données, elles peuvent avoir deux origines : premièrement, une faible valeur observée (proche de ou égale à zéro) ; deuxièmement, une valeur observée sur la référence voisine (du même bloc) plus élevée que la moyenne des références (cfr. Formule 4.1).

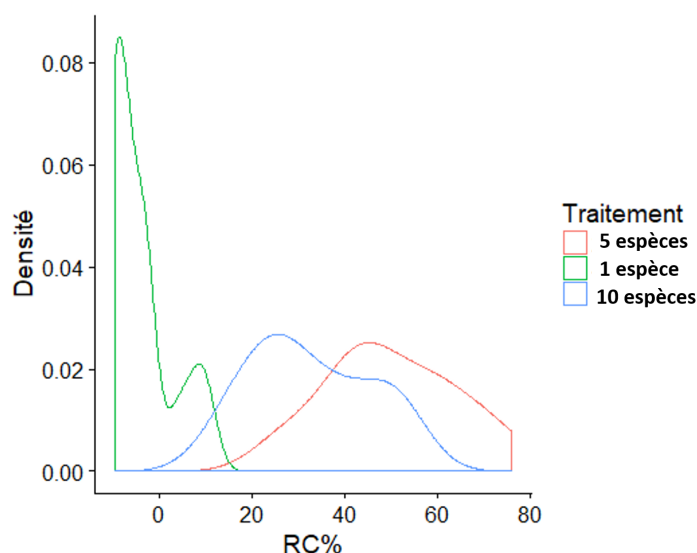


FIGURE III.6 – Densité de distribution des valeurs corrigées pour les taux de colonisation racinaire par les CMA.

La réalisation d'une ANOVA ¹ montre une p-valeur de $2,42 * 10^{-15}$: le facteur traitement

1. Le seuil de décision du test d'hypothèse de l'homogénéité des variances vaut ici 0,01.

a un effet significatif sur le taux de colonisation racinaire. En réalisant un test de Tukey de comparaison des moyennes, il est possible d'observer que les traitements "1, 5 et 10 espèces" sont significativement différents entre eux. Cependant, la référence ("2 espèces") n'est pas significativement différente du traitement "5 espèces" ni du traitement "10 espèces" (Tableau III.8).

TABLEAU III.8 – *Moyennes et écarts-type des mesures corrigées des taux de colonisation racinaire, en %. La colonne "Groupe" représente le résultat d'un test de comparaison des moyennes.*

Traitement	Moyenne	Écart-type	Groupe
1 espèce	-4,242	6,609	C
2 espèces (R)	40,669	13,125	AB
5 espèces	49,952	14,211	A
10 espèces	32,578	12,966	B

Sur le Tableau III.8, il est possible de remarquer que le traitement "1 espèce" (moutarde) présente des taux de colonisation bien plus faibles que les autres traitements (p -valeur $< 0,01$). Le traitement "5 espèces" est celui qui présente les taux de colonisation les plus élevés, sa valeur est significativement supérieure à celles des traitements "1 et 10 espèces" mais ne présente pas de différence significative par rapport au traitement "2 espèces".

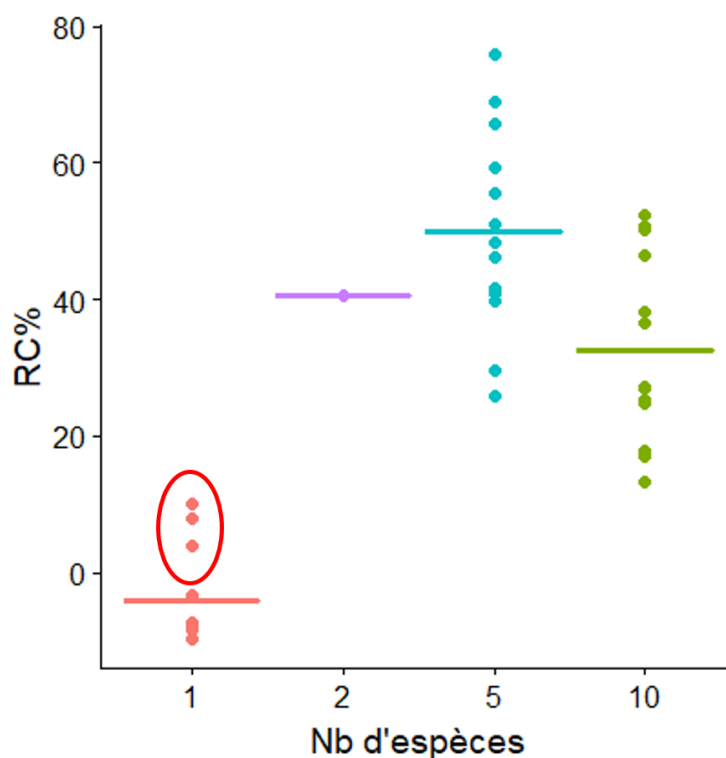


FIGURE III.7 – *Valeurs corrigées et moyennes des taux de colonisation racinaire des couverts végétaux.*

L'observation de la Figure III.7 montre que pour le traitement moutarde, bien que la moyenne générale soit négative (-4,242%), des valeurs positives ont été observées (entourées

en rouge). Elles pourraient être dues à la présence dans les échantillons observés de racines de plantes autres que la moutarde et pouvant être hôtes de CMA. Les valeurs négatives sont dues à la correction des données, comme expliqué ci-dessus.

La régression linéaire du taux de colonisation racinaire en fonction de la biomasse aérienne des couverts (Figure III.8) montre qu'il y a une corrélation positive entre ces deux variables (p-valeur = $3,742 \cdot 10^{-7}$). 45% de la variabilité du taux de colonisation racinaire est expliquée par la biomasse aérienne. Sans considérer les observations réalisées sur le traitement moutarde (points entourés en rouge sur la Figure III.8), il n'est pas possible de démontrer de tendance significative entre ces deux variables. La même tendance est observée pour les valeurs de biomasse racinaire (p-valeur = 0,0001281 pour la régression tenant compte du traitement moutarde) (Figure III.9).

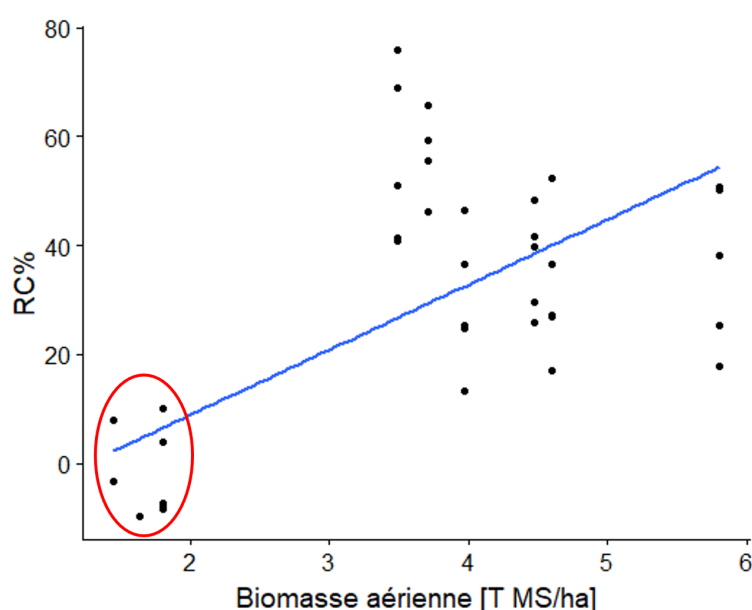


FIGURE III.8 – Régression linéaire de RC% en fonction de la biomasse aérienne. L'équation de la droite est : $\hat{y} = 11,965 x - 15,026$, $R^2 = 0,4551$.

Bien que les teneurs en phosphore ne soient pas significativement différentes au sein de la parcelle, la régression linéaire du taux de colonisation racinaire du couvert végétal en fonction du phosphore disponible (Figure III.10) montre que plus la quantité de ce nutriment augmente dans le sol, moins la colonisation racinaire par des CMA sera importante. Cependant, cette tendance n'est pas significative (p-valeur = 0,4213).

La régression linéaire du taux de colonisation en fonction de la densité de propagules actives dans le sol (Figure III.11) montre que le modèle est significatif (p-valeur = 0,000299). 26% de la variabilité de la valeur de colonisation racinaire (RC%) est expliquée par la valeur de densité de propagules actives (MPN). Cependant, la réalisation d'un modèle linéaire sans tenir compte du premier groupe de points (entouré en rouge sur la Figure III.11) montre qu'il n'y a pas de corrélation entre MPN et RC% (p-valeur = 0,7815, $R^2 = 0,002696$). Ce groupe de points correspond aux mesures réalisées sur le traitement "1 espèce" (moutarde).

Étant donné que les valeurs d'indice de surface verte et d'activité biologique du sol n'étaient pas significativement différentes au sein des différents traitements, ces variables ne permettent

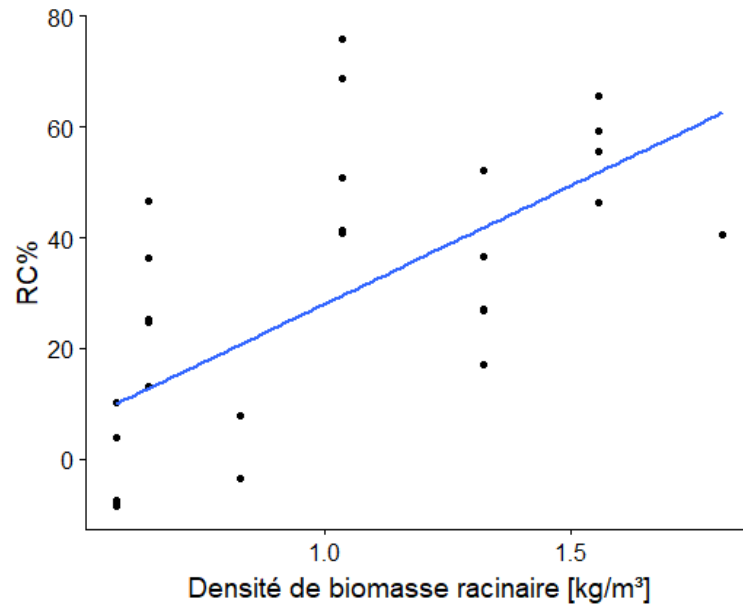


FIGURE III.9 – Régression linéaire de RC% en fonction de la biomasse racinaire. L'équation de la droite est : $\hat{y} = 42,784 x - 14,813$, $R^2 = 0,4021$.

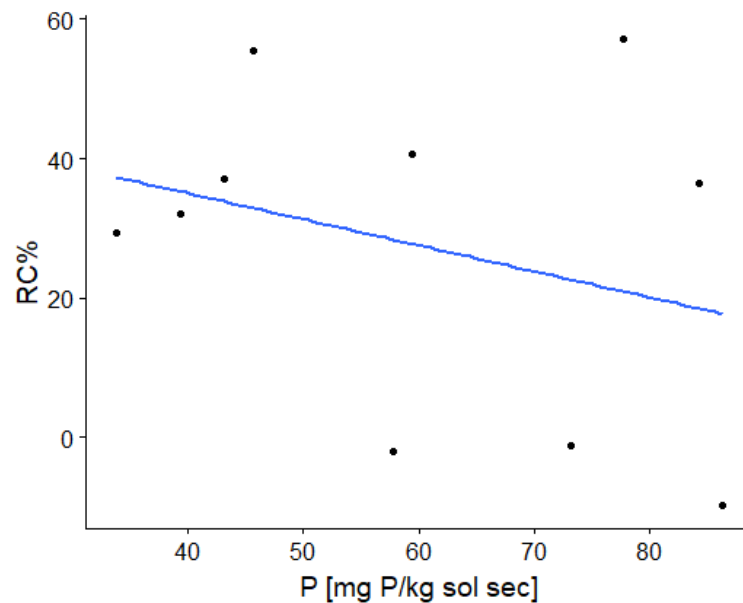


FIGURE III.10 – Régression linéaire du taux de colonisation racinaire en fonction du phosphore disponible dans le sol. L'équation de la droite est : $\hat{y} = -0,3738 x + 50,0001$, $R^2 = 0,0921$.

pas d'expliquer les variations de colonisation racinaire pour les différents traitements.

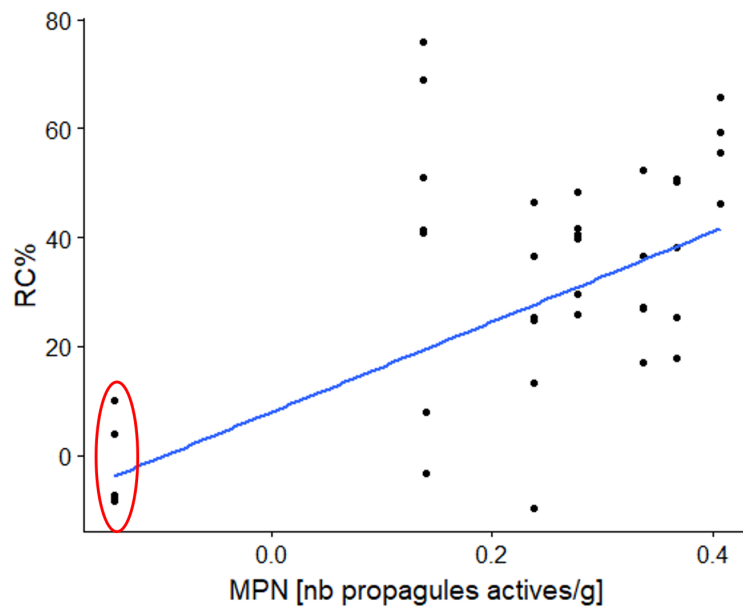


FIGURE III.11 – *Régression linéaire du taux de colonisation racinaire en fonction de la densité de propagules actives de CMA dans le sol. L'équation de la droite est : $\hat{y} = 82,704 x + 7,916$, $R^2 = 0,2596$.*

Chapitre 7

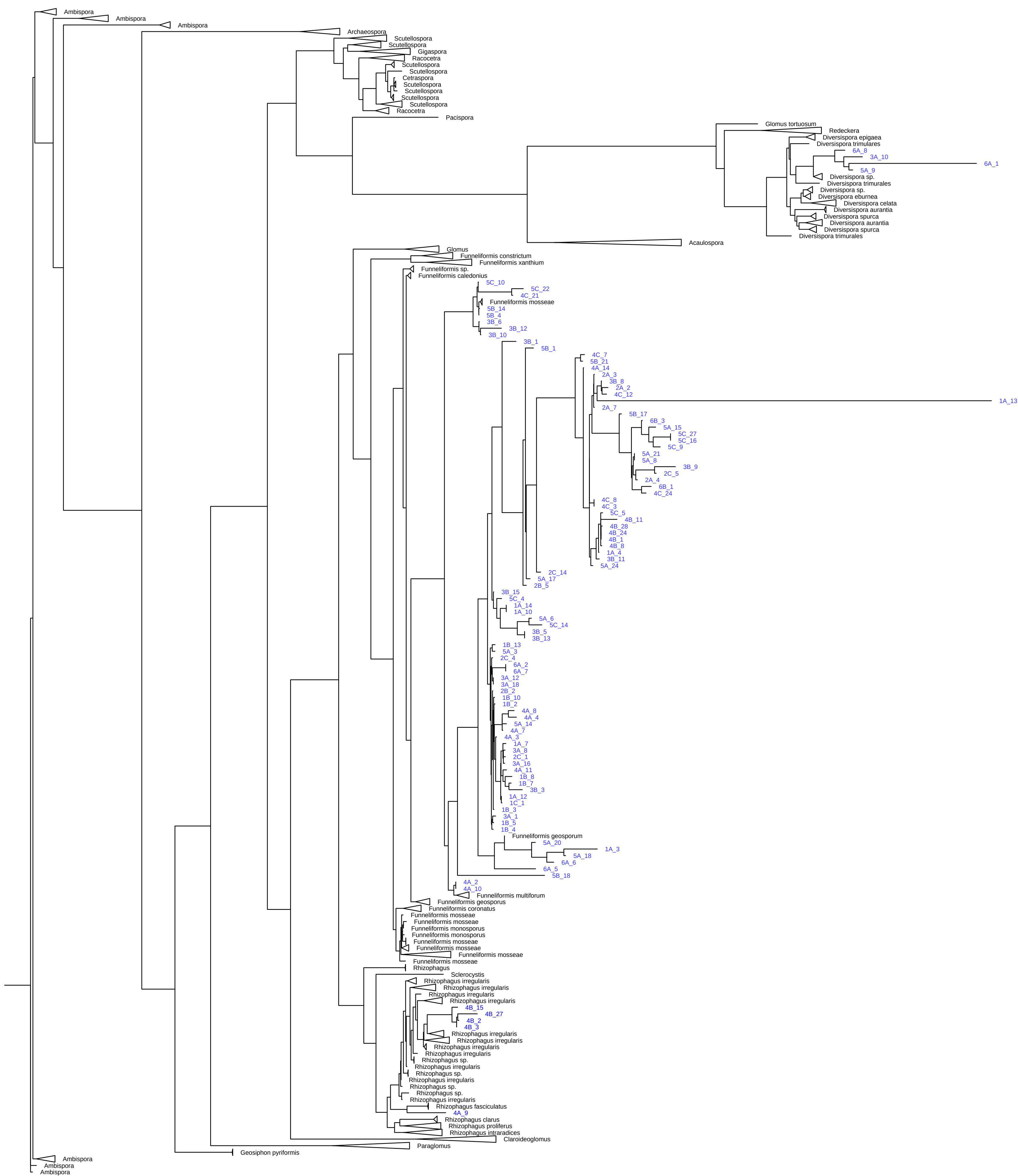
Analyse moléculaire de la biodiversité de CMA

L'analyse de la diversité des espèces de CMA a permis la réalisation d'un arbre phylogénétique représentant les différentes souches détectées sur chaque traitement de la parcelle expérimentale. Cet arbre (cfr. page 78) permet de visualiser la position phylogénétique des souches présentes sur la parcelle expérimentale (en bleu) par rapport aux espèces de CMA déjà connues et décrites dans la littérature. Pour les espèces indiquées en bleu, le premier chiffre représente le numéro de la bande traitement (n° 1 à 6), la lettre désigne le bloc (A, B et C) et le deuxième chiffre représente le numéro du clone duquel le génome a été séquencé. L'échelle représente le nombre moyen de substitutions de nucléotides par site.

Pour le traitement "moutarde", cinq espèces de CMA ont été détectées. Trois espèces appartiennent au genre *Funneliformis* et deux sont du genre *Rhizophagus*. Sur le couvert "2 espèces", trois espèces de CMA ont été observées, elles appartiennent à deux genres différents, *Diversispora* et *Funneliformis*. Le couvert "2 espèces" (référence) est répété trois fois dans le plan expérimental (bandes n° 1, 3 et 5); sur la bande n° 1, seulement l'espèce *Funneliformis geosporum* a été observée, tandis que sur les bandes n° 3 et 5, trois espèces ont été observées : *Diversispora* sp., *Funneliformis mosseae* et *F. geosporum*. Une seule espèce de CMA a été observée sur le traitement "5 espèces", elle fait partie du genre *Funneliformis*. Le traitement "10 espèces" a montré la présence de deux espèces de deux genres différents, *Diversispora* et *Funneliformis*. L'observation de l'arbre permet de remarquer que la plupart des souches détectées sont proches de l'espèce *F. geosporum*. Cette espèce est présente dans tous les traitements.

TABLEAU III.9 – *Diversité d'espèces de CMA pour les différents couverts végétaux.*

Traitement	Nombre d'espèces de CMA	Espèce de CMA
1 espèce	5	<i>Funneliformis geosporum</i> <i>Funneliformis mosseae</i> <i>Funneliformis multiforum</i> <i>Rhizophagus fasciculatus</i> <i>Rhizophagus irregularis</i>
2 espèces (R)	3	<i>Diversispora sp.</i> <i>Funneliformis geosporum</i> <i>Funneliformis mosseae</i>
5 espèces	1	<i>Funneliformis geosporum</i>
10 espèces	2	<i>Diversispora sp.</i> <i>Funneliformis geosporum</i>



0.2

Quatrième partie

Discussion

Chapitre 1

Interprétation des résultats

La partie discussion de ce mémoire analyse les résultats décrits dans la Partie III. Il est important de remarquer que les résultats obtenus et interprétés au cours de cette étude sont spécifiques à l'ensemble des caractéristiques biophysicochimiques du sol de la parcelle expérimentale ainsi qu'aux conditions climatiques rencontrées durant la période de l'essai.

1.1 Couverts végétaux

Il a été démontré par Finney *et al.* (2016) [27] que plus la diversité de plantes composant les couverts végétaux est élevée, plus les services écosystémiques fournis par ces derniers sont nombreux et plus les bénéfices pour la culture suivante sont importants. La production élevée de biomasse par les couverts végétaux est positivement corrélée à l'apport de différents services écosystémiques, comme la suppression des adventices, la prévention du lessivage des nitrates ou encore la production de matière organique. De plus, il a été observé qu'un couvert végétal composé d'un nombre d'espèces plus élevé favorise la production d'une quantité supérieure de biomasse [27]. Le concept clé permettant d'expliquer une production de biomasse plus importante par une diversité de plantes supérieure est appelé complémentarité des espèces [45]. Ce phénomène se produit lorsque des différences sont observées dans la distribution spatiale et temporelle ou dans les stratégies d'utilisation des ressources par les différentes espèces constituant un couvert végétal [27]. Cette complémentarité conduit à une compétition plus faible entre les espèces et à une augmentation de la productivité [45]. Hiiesalu *et al.* (2014) [43] ont également observé que la richesse d'espèces de plantes était positivement corrélée à la biomasse racinaire et à la biomasse totale. Ceci pourrait être expliqué par une meilleure exploitation des ressources qui permet donc une meilleure productivité nette que celle qui serait observée pour une communauté de plantes moins diversifiée.

Cette tendance a également été observée dans le cas de notre étude. En effet, 74% de la variabilité de la biomasse aérienne des couverts végétaux est expliquée par le nombre d'espèces les constituant, pour la densité de semis "densité 1" (Figure III.2). Les couverts constitués d'un mélange d'espèces plus diversifié ont donc produit une biomasse aérienne plus abondante. Cette biomasse plus abondante présente l'avantage d'apporter des services écosystémiques plus nombreux [27].

Il est intéressant de faire remarquer que l'espèce composant le couvert "1 espèce", à savoir la moutarde, n'est pas présente dans les autres mélanges. Il n'est donc pas possible de déterminer si la biomasse inférieure observée pour ce couvert végétal est due au fait qu'il ne contient qu'une

seule espèce ou si cette observation est liée à l'espèce même constituant le couvert végétal. Il en est de même pour le traitement pour lequel aucun couvert végétal n'a été semé (ne contenant que des repousses d'escourgeon provenant de la culture précédente). Les mélanges "2, 5 et 10 espèces" contiennent tous deux espèces en commun (l'avoine brésilienne et le trèfle d'Alexandrie). Le mélange "10 espèces" contient toutes les espèces présentes dans le mélange "5 espèces".

De plus, il a été observé que lorsque la densité de semis est augmentée de 33% ("densité 2"), la production de biomasse moyenne pour ces traitements augmente de 30%. Cependant, pour le traitement "10 espèces", la densité la plus élevée a montré une biomasse légèrement plus faible (résultat non significatif) par rapport à la densité standard. Autrement dit, dans le cas du couvert végétal constitué d'une plus grande diversité d'espèces, une densité de plantes supérieure a été à l'origine d'une plus faible production de biomasse. Bien que cette observation ne soit pas significative et ne permette pas de tirer de conclusions, elle ouvre une perspective suggérant qu'il serait intéressant de déterminer la densité de semis permettant de maximiser la production de biomasse de différents types de couverts végétaux. En effet, il peut exister une compétition entre différentes espèces du couvert.

L'observation au cours du temps de l'évolution de la biomasse de chaque espèce composant les couverts végétaux pourrait apporter des informations intéressantes concernant la dynamique de développement des différentes espèces de plantes. L'analyse des rapports C/N de chaque plante constituant les différents mélanges de couverts permettrait de caractériser ces derniers et d'étudier plus précisément leurs influences sur l'écosystème.

Concernant la biomasse racinaire, aucune différence significative n'a été observée entre les différents traitements. Sans considérer le point aberrant du traitement "5 espèces" (Figure III.3), la valeur de l'indice de surface verte est significativement inférieure pour la moutarde par rapport aux autres traitements. Ceci paraît logique au vu de la faible valeur de biomasse aérienne observée pour cette plante.

1.2 CMA

1.2.1 Densité de propagules actives dans le sol

Il a été observé au cours de l'expérience qu'il n'y avait pas de différence significative quant à la quantité de propagules de CMA actives dans le sol entre les différents couverts végétaux. Cependant, le couvert constitué de moutarde a présenté une quantité moyenne de propagules actives légèrement plus faible (résultat non significatif) que celle des autres traitements (Tableau III.7). La tendance observée pourrait être expliquée par le fait que cette plante est non mycotrophe : elle ne permet donc pas la reproduction des CMA. De plus, la moutarde est une plante produisant des glucosinolates, qui après hydrolyse par une enzyme (myrosinase), produisent des composés biotoxiques comme les isothiocyanates qui pourraient avoir un effet négatif sur les populations de CMA [70], [76]. Il est également intéressant de remarquer que bien que les quantités de phosphore disponible ne soient pas significativement différentes entre les différents traitements (Tableau III.5), les teneurs de cet élément dans le traitement moutarde ("1 espèce") sont plus élevées que chez les autres traitements. Cette teneur plus élevée peut donc avoir eu une influence négative sur la quantité de propagules de CMA présentes dans le sol de ce traitement [19].

Nous avons pu observer que le nombre d'espèces végétales constituant le couvert était positivement corrélé à la quantité de propagules actives dans le sol (Figure III.4). En effet, 30% de la variabilité de la quantité de propagules de CMA actives dans le sol est expliquée par le nombre d'espèces constituant le couvert végétal. Sans considérer l'effet dû au traitement contenant la moutarde, cette valeur vaut seulement 5%. Ceci démontre donc que l'effet sur les CMA en présence de moutarde est relativement important.

En observant l'évolution de la quantité de propagules actives dans le sol au cours du temps (Tableau III.7), il est possible de remarquer que le couvert constitué de dix espèces a triplé la quantité de propagules actives dans le sol par rapport aux valeurs observées dans le sol avant le semis des couverts végétaux. Aucune différence significative n'a été observée concernant l'évolution dans le temps de la quantité de propagules actives sur les traitements "1, 2 et 5 espèces". La croissance du potentiel d'inoculum dans le sol suite à la culture du couvert végétal "10 espèces" pourrait être justifiée par deux hypothèses. Premièrement, il est possible d'expliquer ce résultat par la plus grande diversité d'espèces constituant ce couvert végétal par rapport aux autres. Celui-ci permettrait de fournir un environnement plus favorable pour le développement des CMA [70]. Deuxièmement, cette observation peut être due à l'identité des espèces constituant le couvert végétal. En effet, le couvert "10 espèces" est constitué de dix espèces de plantes, dont huit sont reconnues comme hôtes des CMA, alors que le couvert "5 espèces" n'en contient que cinq, le couvert "2 espèces" deux, et le couvert "1 espèce" aucune (cfr. *infra*).

Wang *et al.* (2008) [107] ont observé que la valeur MPN variait entre 0,017 et 3,3 propagules/g de sol, pour des analyses réalisées sur 50 échantillons de sols différents prélevés en Chine. Une telle variation dans le nombre de propagules n'est pas étonnante sachant la grande diversité d'environnements desquels étaient issus les échantillons. De plus, 59% de cette variabilité a pu être expliquée par les plantes hôtes, le phosphore disponible et le pH du sol. Les valeurs observées dans ce mémoire varient entre 0,0784 propagules actives/ g de sol pour le traitement moutarde et 0,314 propagules actives/ g de sol pour le traitement "10 espèces".

Njeru *et al.* (2013) [70] ont testé l'hypothèse selon laquelle une plus grande diversité d'espèces constituant un couvert végétal fournit un environnement plus favorable pour le développement des CMA. Les conclusions de l'étude montrent que le choix des espèces de plantes appropriées dans la constitution d'un couvert végétal est plus important que la diversité d'espèces le constituant. Öpik *et al.* (2010) [74] ont démontré que la majorité des taxa de CMA n'étaient pas affectés par la diversité d'espèces de plantes hôtes. Afin de favoriser le développement des CMA, il est donc essentiel de maximiser la présence d'espèces favorables à ces derniers et minimiser les espèces non hôtes ou ayant un effet adverse contre ces microorganismes [70].

Il a également été observé dans ce mémoire que plus la biomasse du couvert végétal est abondante, plus la quantité de propagules actives dans le sol est élevée ($R^2 = 0,44$ pour la biomasse aérienne (Figure III.5) et $R^2 = 0,51$ pour la biomasse racinaire). Ceci confirme le résultat précédent selon lequel le couvert "10 espèces" favorise l'augmentation de la quantité de propagules dans le sol. En effet, la quantité de biomasse aérienne est corrélée positivement au nombre d'espèces constituant le couvert ($R^2 = 0,74$) (Figure III.2). Ceci peut s'expliquer par le fait que les couverts constitués d'une plus grande diversité d'espèces produiront une biomasse plus importante et fourniront un habitat plus diversifié et plus favorable au développement des différentes espèces de CMA, à condition qu'ils contiennent un plus grand nombre d'espèces

hôtes des CMA. En effet, certains CMA se développent plus facilement en présence de certains hôtes spécifiques.

La valeur du pourcentage de colonisation racinaire varie selon la saison et ne présente souvent aucune corrélation avec le nombre de propagules actives [24] ni avec les bénéfices apportés par les CMA [30], [68]. La mesure du potentiel d'inoculum de CMA par la méthode MPN présente l'avantage de ne pas présenter ces caractéristiques. Sans tenir compte du traitement contenant la moutarde comme couvert, aucune corrélation n'a été observée entre la quantité de propagules actives dans le sol et les taux de colonisation racinaire (Figure III.11). En effet, les mesures réalisées dans le traitement contenant la moutarde ont montré une très faible présence de CMA, que ce soit concernant la colonisation racinaire ou la quantité d'inoculum dans le sol. L'approche MPN, bien que exigeante en travail, permet d'augmenter la fiabilité des résultats par rapport à une mesure réalisée sur une seule dilution du substrat contenant l'inoculum [61].

Il est écrit dans la littérature que certains CMA peuvent sporuler seulement après une période allant jusqu'à huit mois de culture en présence d'une plante piège [71]. Les prélèvements d'échantillons utilisés pour l'analyse MPN n'ayant été réalisés que cinq mois après le semis des couverts végétaux hôtes des CMA, il est possible que certaines espèces de CMA n'aient pas encore sporulé et n'aient donc pas été détectées lors de cette analyse. De plus, il serait intéressant d'analyser la compatibilité de la plante piège utilisée lors de l'essai MPN (maïs) avec différentes espèces de CMA.

1.2.2 Taux de colonisation racinaire par les CMA

Les taux de colonisation observés chez le couvert constitué de moutarde sont faibles. De plus, les observations sont toutes groupées de manière plus dense autour de zéro par rapport aux observations réalisées sur les traitements "5 et 10 espèces" (Figure III.6). En effet, la variance est plus faible pour ce traitement (Tableau III.8). L'effet du traitement moutarde sur les taux de colonisation racinaire par les CMA est donc fortement marqué. Dans une étude menée par Njeru *et al.* (2013), le potentiel de mycorhization du sol a diminué de 56,5% après une culture de moutarde indienne (*Brassia juncea* L. Czern.). Ceci s'explique par la libération de composés chimiques biotoxiques dans le sol, comme les isothiocyanates, issus de la dégradation des glucosinolates [70], [108]. Koide et Peoples (2012) [56] ont également démontré qu'une culture de colza (*Brassica napus*) précédant une culture de maïs a diminué les taux de colonisation. Ces observations seraient dues à une réduction de la quantité de propagules de CMA pendant la période hivernale ; en effet, ces champignons étant des biotrophes obligatoires, ils dépendent des sources de carbone fournies par les plantes hôtes pour leur survie et pour le maintien d'un réseau d'hyphes extraracinaires qui permet la colonisation mycorhizienne des plantes voisines [34]. De plus, il a été démontré que l'incorporation de tissus de *B. juncea* dans le sol comme engrais vert provoque la production, lors de la décomposition de la biomasse, de composés biotoxiques comme des isothiocyanates, qui auraient un effet inhibiteur sur les CMA [76]. Étant donné que la moutarde ne mycorhize pas, les valeurs de colonisation racinaire positives observées pour ce traitement (entourées en rouge sur la Figure III.7) peuvent être expliquées par la présence dans les échantillons observés de racines d'autres plantes que la moutarde comme des repousses du précédent cultural ou des adventices ayant pu être des hôtes de CMA.

Il est surprenant d'observer une colonisation racinaire du traitement "10 espèces" plus faible que celle du traitement "5 espèces". Ceci peut être dû à la présence dans le couvert "10 espèces"

d'une ou plusieurs espèce(s) moins ou non colonisée(s) par les CMA. Les espèces supplémentaires présentes dans le couvert "10 espèces" par rapport au couvert "5 espèces" sont le nyger, le sarrasin, le radis chinois, la vesce commune et la féverole. Les deux dernières espèces (genre *Vicia*) sont connues pour être des hôtes favorables à la colonisation par les CMA [31], [70], [94], [106]. Le radis chinois fait partie de la famille des Brassicacées, connue pour être défavorable à la colonisation par les CMA [70], [106]. Le sarrasin est décrit comme une plante non mycotrophe [28], [37], [106]. Le nyger est une plante répondant positivement à la colonisation par les CMA [86]. Les autres espèces communes aux mélanges "5 et 10 espèces" sont toutes hôtes des CMA [67], [108]. L'origine du pourcentage de colonisation racinaire significativement plus faible du couvert "10 espèces" par rapport au couvert "5 espèces" peut donc être due à la présence des deux espèces non ou peu colonisées par les CMA (radis chinois et sarrasin). Afin de déterminer de manière précise l'origine de cette valeur significativement plus faible, il serait intéressant d'observer la colonisation racinaire de chaque espèce de plante constituant chaque couvert végétal.

La régression des taux de colonisation racinaire en fonction de la biomasse montre qu'il y a une corrélation positive significative entre ces deux variables (pour la biomasse aérienne, $R^2 = 0,45$ (Figure III.8) et pour la biomasse racinaire, $R^2 = 0,40$ (Figure III.9)). De nouveau, il est possible d'observer que le traitement "1 espèce" (moutarde) a une forte influence dans cette relation (Figure III.8); en effet, si les observations réalisées sur la moutarde ne sont pas tenues en compte dans la régression, il n'est pas possible de prouver l'existence d'une corrélation significative entre les deux variables.

Les teneurs en phosphore du sol n'étant pas significativement influencées par le facteur traitement, il a été considéré que la distribution de cet élément dans le sol était homogène au sein de la parcelle. Il a été démontré par Covacevich *et al.* (2007) [19] qu'il existe une corrélation positive entre les teneurs en phosphore du sol et la biomasse aérienne et racinaire du blé. Il a également été observé par Covacevich *et al.* que les teneurs en phosphore disponible sont négativement corrélées aux taux de colonisation racinaire. L'étude montre qu'entre 0 et 20 cm de profondeur, les teneurs en phosphore du sol sont le principal facteur explicatif de la variation de colonisation racinaire par les CMA. Deux mécanismes expliquent la réduction de la colonisation racinaire par les teneurs en phosphore élevées. Premièrement, une exsudation racinaire réduite; deuxièmement, les hautes concentrations en phosphore ont un effet négatif direct sur le développement des hyphes extracellulaires des CMA [19]. Des taux de colonisation faibles en présence de teneurs élevées en phosphore ont également été observés par Douds *et al.* (2007) [25]. Ils démontrent que les plantes se développant dans des milieux riches en phosphore (50 à 140 mg P/kg sol sec) limitent la colonisation de leurs racines par des CMA afin de minimiser le coût en carbone dû à l'établissement de la symbiose dans des situations où les bénéfices de cette dernière seraient peu importants. Dès lors, les CMA peuvent être à l'origine d'applications intéressantes dans un contexte d'agriculture durable. L'utilisation efficace des CMA pourrait donc permettre d'atteindre des rendements optimaux tout en minimisant les doses de fertilisants, permettant ainsi de réduire les coûts et les risques de pollution environnementale [19].

Dans le cadre de ce mémoire, la teneur en phosphore moyenne observée sur la parcelle expérimentale est de 60 mg P/kg. Pour les traitements "2, 5 et 10 espèces", les taux de colonisation racinaire oscillent autour de 41%. Les traitements "2 et 5 espèces" ne sont pas significativement différents entre eux, il en est de même pour les traitements "2 et 10 espèces". Le traitement "5 espèces" est significativement différent du traitement "10 espèces". La régression linéaire

des taux de colonisation en fonction du phosphore disponible ne présente pas de tendance significative. Cependant, il est possible d'observer une légère corrélation négative entre ces deux variables (Figure III.10). En effet, la dépendance mycorhizienne des plantes hôtes diminue avec la quantité de phosphore disponible dans le sol car celles-ci n'ont pas besoin des hyphes mycorhiziens pour une meilleure absorption du phosphore à partir de la solution du sol [94].

Il serait intéressant d'analyser les teneurs en phosphore des couverts végétaux, en différenciant les teneurs présentes dans la biomasse aérienne des teneurs présentes dans les racines, afin d'étudier les relations existant avec le phosphore disponible et avec les taux de colonisation par les CMA [19].

Il a été observé que 26% de la variabilité de la colonisation racinaire est expliquée par la densité de propagules actives dans le sol. Il est intéressant de relever qu'il n'existe aucune corrélation significative entre ces deux variables si les valeurs du traitement moutarde ne sont pas tenues en compte. L'absence de relation entre ces deux variables peut être partiellement due à la présence d'hyphes viables dans les segments de racines. En effet, pour certaines espèces de CMA, les racines sèches dans le sol peuvent jouer un rôle de propagules [99].

1.2.3 Biodiversité de CMA

La présence de cinq espèces différentes de CMA a été observée dans le traitement moutarde ("1 espèce"). Sachant que cette plante est connue pour avoir un effet négatif sur le potentiel mycorhizien du sol [70], ce résultat peut être justifié par la présence d'autres plantes mycotrophes sur ce traitement comme des repousses de précédents culturels ou des adventices. De plus, cette diversité peut être justifiée par le fait que les CMA peuvent survivre plusieurs années dans les sols [5]. Il est également possible de remarquer que les résultats ne sont pas homogènes : en effet, les observations des trois bandes "2 espèces" (ou référence) ont donné des résultats différents. Une seule espèce de CMA a été détectée sur la bande n° 1, alors que trois espèces ont été détectées sur les bandes n° 3 et 5. Les espèces de CMA observées lors de ce mémoire appartiennent toutes à deux familles : les Diversisporaceae et les Glomeraceae (Annexes, Tableau V.15). Il ne semble pas exister de corrélation particulière entre la diversité de CMA et la diversité d'espèces de plantes.

En observant l'arbre phylogénétique (cfr. page 78), il est possible de remarquer que la plupart des souches séquencées sont situées à proximité les unes des autres et que l'espèce connue qui est la plus proche de ces dernières est *Funneliformis geosporum*. Cette observation peut être due à des biais issus de l'analyse des profils de restriction enzymatique. Lors de l'analyse des différents profils de restriction (au cours de laquelle chaque différent profil de restriction est considéré comme la représentation d'une différente souche de CMA) (Annexes, Figure V.2), il est possible que des profils qui sont en réalité identiques aient été considérés comme différents. Il est également possible de commettre une erreur en considérant comme identiques des profils qui sont en réalité différents. En effet, l'intensité des profils est relativement variable d'une souche à l'autre et peut être à l'origine d'erreurs de différenciation. Afin d'éliminer ce biais, il est possible d'augmenter le nombre d'enzymes de restriction utilisées afin de permettre de croiser les résultats obtenus pour chaque enzyme. Cependant, la charge de travail supplémentaire pour l'analyse des profils issus de trois enzymes de restriction (ou plus) est relativement importante. Le choix des enzymes de restriction influence grandement la capacité à distinguer différentes espèces de CMA. Selon Dickie *et al.* (2007) [23], il est déconseillé d'utiliser des enzymes comme

HinfI, dont le site de restriction se situe dans des régions du génome conservées (5.8 S) car elles ne permettent pas une bonne discrimination des espèces.

Van der Heijden *et al.* (1998) [101] ont démontré que la diversité de la composition de la communauté de CMA avait une influence sur la composition de la communauté de plantes ainsi que sur la viabilité et la productivité des écosystèmes. Cependant, l'hypothèse testée ici est différente, elle est basée sur ce que l'on connaît sous le nom de "l'hypothèse de la diversité de plantes", qui propose qu'une diversité de plantes plus importante augmente la variabilité micro-climatique et la complexité de l'habitat, comme par exemple la structure du sol et l'architecture racinaire [43]. Un habitat plus diversifié permettra donc probablement un développement plus favorable des CMA dans le sol. Une relation positive a été observée entre la diversité d'espèces de CMA et de plantes par Hiiesalu *et al.* (2014). Cependant, la nature de la relation entre la composition de la communauté de CMA et de la communauté végétale dépend de nombreux facteurs comme l'identité des organismes impliqués, les conditions environnementales, la disponibilité en nutriments, etc... Dans notre étude, aucune tendance significative n'a pu être remarquée.

Oehl *et al.* (2003) [71] ont réalisé une étude de la diversité d'espèces de CMA présente sur une série de huit sites situés en Europe centrale (France, Allemagne et Suisse) sur une zone de 1 000 km². Les huit sites analysés bénéficiaient de conditions climatiques et pédologiques similaires mais différaient dans l'intensité d'utilisation de la terre. Au cours de cette étude, 45 espèces de CMA ont été détectées, dont 20% n'avaient pas été décrites précédemment. 25 espèces ont été détectées dans les écosystèmes naturels, tandis que 18 ont été observées dans les systèmes d'agriculture conventionnelle avec rotation et seulement 8 sur les terres dédiées aux monocultures. Ces observations marquent clairement l'influence négative de l'intensification de l'agriculture sur les populations de CMA.

Il a également été observé par Oehl *et al.* (2003) [71] que les systèmes cultivés de manière intensive ont provoqué la diminution d'espèces pour lesquelles la sporulation est tardive. En effet, la stratégie de colonisation des racines et la dynamique de production de spores sont cruciales pour la survie des espèces de CMA dans les systèmes de monocultures intensive, caractérisés par l'application d'herbicides, des courtes périodes de végétation et un sol nu pendant des périodes prolongées. Les pratiques d'utilisation des terres ont donc sélectionné certains écotypes en fonction de leurs caractéristiques physiologiques. Les CMA rencontrés dans les agroécosystèmes intensifs se sont souvent avérés être moins efficaces dans la stimulation de la croissance des plantes que ceux rencontrés dans les systèmes à faibles intrants [71]. Les CMA appartenant aux espèces *F. geosporum* et *F. mosseae* sont connus pour être des généralistes, c'est-à-dire qu'ils peuvent être trouvés dans une large gamme d'environnements. De plus, ils sont souvent retrouvés dans la plupart des agroécosystèmes cultivés [66], [71].

Les analyses moléculaires présentent l'avantage de pouvoir identifier des espèces de CMA à partir de fragments de racines de plantes hôtes sans devoir passer par l'évaluation des morphotypes des spores [71]. De plus, l'analyse moléculaire de la biodiversité permet la détection d'une diversité de CMA bien plus élevée que celle qui aurait été obtenue en se basant sur des critères morphologiques. En effet, des espèces similaires morphologiquement peuvent présenter une large gamme de variation génétique [55]. Dans l'optique d'éventuelles applications visant à tester l'efficacité d'inoculations de CMA, les outils moléculaires seront indispensables pour observer la compatibilité d'inocula de CMA avec différentes cultures et pour tester leur persistance

sur le champ [71].

1.3 Bilan des différents couverts végétaux

Les couverts végétaux sont un élément essentiel dans la rotation des cultures sur une parcelle permettant d'améliorer les performances de l'agroécosystème. Dans la plupart des cas, la culture de mélanges d'espèces de plantes constituant les couverts végétaux semble apporter une plus large gamme de bénéfices que la culture d'une seule espèce. En effet, chaque espèce de plante présente des caractéristiques différentes et a donc des impacts précis sur les nombreuses composantes de l'écosystème. La combinaison des espèces appropriées permet donc l'apport de services écosystémiques complémentaires. Le choix des espèces constitue donc une étape clé dans la bonne gestion des systèmes agricoles. Les mélanges d'espèces caractérisés par une large diversité de traits fonctionnels représentent donc une stratégie pour augmenter les services écosystémiques fournis par les couverts végétaux.

Concernant les effets de la moutarde sur le système sol-plante, cette étude a permis de conclure que les impacts de la moutarde sur l'écosystème ne sont pas les plus intéressants dans la gestion de la qualité des sols. En effet, la production de biomasse et l'indice de surface verte de la moutarde sont relativement faibles, ce qui ne permet pas d'assurer un apport important en matière organique dans le sol. De plus, cette plante a présenté des taux de colonisation racinaire proches de zéro et a eu un effet néfaste sur la persistance des propagules dans le sol pour la culture suivante. La moutarde a donc eu des effets négatifs sur le potentiel de mycorhization du sol. Son avantage principal réside dans sa rapide couverture du sol permettant la lutte contre l'érosion, si elle est mélangée à d'autres espèces complémentaires.

Le recours à la moutarde comme culture de couverture est souvent rencontré en Belgique dû à son faible coût, son implantation facile, sa croissance rapide, son bon piégeage de l'azote, ainsi que pour son effet de lutte contre les adventices. Ce couvert présente le désavantage que son développement important (dû par exemple à un semis précoce) peut mener à la lignification des plantes et peut finalement provoquer un rapport C/N défavorable [17] (proche de 35 ; or, au delà de 25, cette valeur signifie que l'activité prolongée des microorganismes provoque une immobilisation de l'azote disponible dans le sol [113]).

Constanzo *et al.* (2014) [18] ont remarqué que *Vicia villosa*, une plante hôte des CMA, a permis de mieux maintenir la communauté de CMA que *Brassica juncea*, une plante non-hôte ; en effet, les plantes de maïs qui ont poussé après une culture de vesce ont présenté des meilleurs taux de colonisation racinaire que des maïs cultivés après une culture de moutarde indienne. La vesce est donc un bon hôte des CMA. Un niveau de diversité élevé d'espèces composant les couverts végétaux a diminué la colonisation racinaire par les CMA des maïs cultivés postérieurement, par rapport aux traitements de vesce. Ceci indique que l'identité des espèces d'un couvert végétal est plus importante que la diversité des plantes qui le composent [18].

Le mélange de deux espèces (avoine brésilienne et trèfle d'Alexandrie) présente une bonne complémentarité des espèces le constituant. Sa biomasse aérienne et racinaire est élevée, de plus, la complémentarité entre céréale et légumineuse permet une minéralisation progressive de l'azote et du carbone, optimale pour la culture suivante [27]. Les taux de colonisation racinaire par les CMA sont également favorables. Concernant le mélange constitué de cinq espèces, pour tous les indicateurs analysés, aucune différence significative n'a été observée par rapport à celui

qui n'en contenait que deux.

La biomasse du mélange de dix espèces n'est pas significativement différente de celle des mélanges de deux et de cinq espèces. Ce mélange a eu un impact significatif sur la communauté de CMA en triplant la quantité de propagules dans le sol par rapport aux quantités observées avant la culture des couverts végétaux. Certaines espèces constituant ce mélange n'étaient pas hôtes des CMA, ce qui a provoqué des taux de colonisation racinaire plus faibles que ceux observés sur le mélange de cinq espèces.

Finalement, il est difficile de faire ressortir l'effet spécifique dû à la composition de chaque mélange de plantes constituant les couverts végétaux. En effet, les différentes espèces ont chacune des effets spécifiques sur les communautés microbiennes du sol. Il existe également de nombreuses interactions entre les différents microorganismes composant cette communauté du sol et pouvant influencer les paramètres observés. De plus, la présence de repousses d'escourgeon a pu amortir les effets des différents traitements sur les caractéristiques du système sol-plante observées dans cette étude.

Il a été démontré par Jansa *et al.* (2008) [46] que la colonisation de plantes par différentes espèces de CMA apportait plus de bénéfices concernant le prélèvement de phosphore de la solution du sol par rapport à la colonisation par une seule espèce de CMA, grâce à l'existence d'une complémentarité fonctionnelle entre les différentes espèces fongiques. En effet, les stratégies de prélèvement du phosphore par les CMA varient d'une espèce à l'autre : les CMA diffèrent dans les distances des hyphes par rapport à la racine, dans l'efficacité d'absorption du phosphore de la solution du sol (quantité de phosphore absorbée par unité de longueur d'hyphe), etc... La réponse des plantes à la colonisation par des CMA peut également varier largement : celle-ci peut être positive ou négative selon la plante, l'espèce de CMA ou les conditions environnementales [46].

Xiang *et al.* (2014) [114] ont démontré que l'utilisation du sol a un impact sur les communautés de CMA en indiquant que les concentrations élevées en phosphore et le manque de structure du sol provoqués par la fertilisation et le labour ont un effet particulièrement négatif sur la communauté de CMA. De plus, l'incorporation de couverts végétaux dans le sol est souvent réalisée une fois celui-ci détruit. Cependant, il a été observé par Njeru *et al.* (2014) [70] que cette pratique provoque une baisse importante du potentiel d'inoculum mycorhizien du sol [50], [113]. Le labour provoque également une décroissance de la matière organique, une diminution de la stabilité des agrégats, une perte de l'humidité du sol, ce qui est défavorable à la microflore du sol [50], [70]. Afin d'éviter ces conséquences néfastes, il est possible de semer la culture suivante dans les débris de couverts végétaux (après leur destruction mécanique). Le non-labour est donc une pratique permettant de conserver la qualité des sols et présente un avantage économique pour l'agriculteur. Si le réseau d'hyphes de CMA n'est pas perturbé, la culture suivante réalisera une connexion plus rapide avec ce réseau et sa capacité d'absorption des nutriments du sol sera alors améliorée.

Chapitre 2

Conclusions et perspectives

Les CMA sont des champignons biotrophes ; leur viabilité dépend donc de la présence de plantes hôtes. Afin de maximiser les bénéfices apportés par les CMA à la culture suivante, il est essentiel de préserver l'inoculum dans le sol pendant les périodes interculturelles [50]. C'est à ce niveau que les couverts végétaux jouent un rôle important dans la gestion de l'écosystème, en favorisant le développement et le maintien de ces microorganismes du sol.

Les pratiques courantes en agriculture intensive comme le labour, les monocultures, les périodes de jachère saisonnières ainsi que l'application de nutriments inorganiques et de produits de synthèse pour la lutte contre les ennemis des cultures, provoquent la chute des populations de CMA et donc la baisse des bénéfices qu'ils peuvent apporter aux cultures, comme la meilleure acquisition de nutriments, la résistance accrue aux maladies et la meilleure tolérance à la sécheresse. Au vu de l'épuisement rapide des réserves mondiales en phosphore ainsi qu'à leur prix croissant, les bénéfices apportés par les CMA représentent un potentiel important dans le cadre de l'agriculture durable. Les couverts végétaux ont la capacité d'augmenter le potentiel d'inoculum indigène de CMA dans le sol [61]. L'ajout de couverts végétaux dans les systèmes de production agricole apporte de nombreux bénéfices à la culture suivante ainsi qu'à la santé du sol.

Le recours aux CMA permet de diminuer de manière efficace le lessivage des nutriments dans les écosystèmes cultivés de manière intensive [6]. La diminution des teneurs en NO_3^- , NH_4^+ et phosphates retrouvées dans les eaux de lessivage pourrait être attribuée à une absorption d'eau plus importante réalisée grâce à une plus grande taille des plantes mycorhizées [6]. Cet effet peut également être expliqué par l'amélioration de la structure du sol par les CMA dans la mycorhizosphère, rendant ainsi possible une rétention d'eau plus importante. De plus, les CMA facilitent l'absorption de l'azote inorganique en affectant les taux de nitrification. Les teneurs en azote inorganique dans le sol sont donc plus faibles, permettant alors de limiter le lessivage [104].

Les mélanges d'espèces constituant les couverts végétaux privilégient la présence de conditions favorables pour le développement des CMA [61]. L'hypothèse suivante a donc pu être émise à l'issue de cette étude : il serait idéal de constituer un mélange végétal en combinant une (ou plusieurs) espèce(s) végétale(s) à croissance rapide (comme l'avoine) avec une (ou plusieurs) espèce(s) survivant à la période hivernale, dans le but de fournir une gamme diversifiée d'hôtes de CMA entre deux cultures principales et afin d'augmenter le potentiel d'inoculum mycorhizien du sol [52], [61]. Le choix des espèces adéquates pour la composition d'un couvert végétal est donc tout aussi important que la diversité d'espèces le constituant. Le remplacement

des périodes de jachère par la culture de couverts végétaux permet d'augmenter le potentiel mycorhizien, d'augmenter la colonisation racinaire par des CMA et ainsi d'améliorer les performances des cultures suivantes [61].

Il a été observé au cours de ce mémoire que le couvert "10 espèces" est le seul ayant permis d'augmenter la densité de propagules actives de CMA dans le sol par rapport à la quantité observée dans le sol avant la culture du couvert végétal. Ce couvert est celui contenant le plus d'espèces végétales hôtes de CMA par rapport aux autres couverts végétaux étudiés. De plus, il a été observé que la biomasse du couvert végétal était positivement corrélée à la densité de propagules actives dans le sol. Or, il a également été remarqué au cours des expériences réalisées que la biomasse d'un couvert végétal était positivement influencée par le nombre d'espèces le constituant. Ces éléments sont intéressants à prendre en compte pour la composition des mélanges de couverts sachant qu'une biomasse supérieure apporte des services écosystémiques plus abondants [27]. Concernant les taux de colonisation racinaire des couverts végétaux, la moutarde a présenté des valeurs significativement plus faibles que les autres traitements. Finalement, l'analyse moléculaire de la biodiversité de CMA ayant colonisé les racines des différents couverts végétaux a permis d'observer la présence de CMA de cinq espèces différentes appartenant à deux familles distinctes.

Cette étude a donc permis de mieux comprendre les interactions existant dans le système sol-plante entre les couverts végétaux et les CMA. L'étude des CMA réalisée dans ce mémoire s'insère dans le contexte d'une analyse plus globale de l'influence des mélanges de couverts végétaux sur différents paramètres du phytobiome¹. Afin d'analyser et d'interpréter de manière correcte et précise l'influence de différents couverts végétaux sur certains paramètres du phytobiome, il est essentiel de s'intéresser à la globalité du système afin d'appréhender l'ensemble des interactions existant entre les nombreux acteurs de l'écosystème. En effet, dans le but de comprendre en profondeur le fonctionnement de l'agroécosystème entourant la culture des couverts végétaux, l'étude de l'ensemble du phytobiome permet d'atteindre ces objectifs. Cependant, il est important de faire remarquer que le système étudié est hautement dynamique et qu'il présente une certaine résilience face aux facteurs culturels. Le suivi de la parcelle sur une plus longue durée permettra d'observer les impacts sur le long terme des couverts végétaux sur les différents paramètres biologiques de l'écosystème.

Le suivi des parcelles sur le long terme fournira la possibilité d'analyser de manière plus précise l'impact des couverts végétaux et les influences existant au sein du système. Le sol et les microorganismes qu'il contient évoluent lentement, et leur observation pendant une année n'est pas représentative des changements qu'ils subissent suite à la mise en place d'un couvert végétal. De plus, la variabilité climatique, les caractéristiques intrinsèques à la parcelle et le système de rotation font que les observations réalisées ne représentent que de manière momentanée un système hautement dynamique. La réalisation d'observations pendant plusieurs années est donc essentielle. La recherche réalisée au cours de ce mémoire représente un intérêt dans le cadre de son intégration à un projet réalisé sur le long terme.

La mise en place d'un essai sur parcelle expérimentale permet de représenter de manière

1. Le phytobiome comprend l'ensemble des microbes à l'intérieur et à l'extérieur de la plante, le sol autour de la plante, et les autres organismes en contact avec la plante et influencés par celle-ci, en incluant les insectes, les invertébrés, et les nématodes. Il inclut aussi les environnements physique et chimique qui fournissent un contexte crucial dans les interactions biotiques [115].

proche de la réalité les conditions rencontrées par les agriculteurs. Cependant, la réalisation d'un essai sur parcelle agricole présente certaines limitations. De nombreuses variables ne sont pas contrôlées par l'expérimentateur, comme les conditions météorologiques, les conditions du sol, ou encore l'homogénéité des caractéristiques de la parcelle avant le début de l'essai. De plus, l'essai en parcelle représente des contraintes mécaniques comme l'utilisation de matériel agricole qui restreint le design du plan expérimental des différents traitements.

Il serait intéressant d'étudier la colonisation des racines de la culture suivante par les CMA. Une étude réalisée par Njeru *et al.* (2013) [70] démontre que les taux de colonisation racinaires de maïs cultivés après la culture d'un couvert végétal constitué d'un mélange de sept espèces étaient supérieurs par rapport aux taux observés sur des maïs cultivés après une jachère sur laquelle aucun couvert n'avait été semé. La biomasse, le contenu en azote et en phosphore de la partie aérienne des plantes de maïs a également augmenté avec la colonisation mycorhizienne. Kabir *et al.* (2002) [52] ont démontré que la biomasse sèche de la partie aérienne du maïs était influencée par la présence d'un couvert végétal. De plus, il a été observé que la culture de couverts végétaux précédant la culture de maïs a permis d'augmenter son rendement, quel que soit le type de couvert végétal (avoine, seigle ou un mélange des deux). Le couvert végétal a eu une influence sur la disponibilité du phosphore dans le sol. En effet, une fois morts, les couverts végétaux ont libéré grâce au processus de minéralisation le phosphore qu'ils avaient accumulé pendant leur développement. De plus, le couvert végétal a permis d'augmenter la colonisation des racines de maïs par les CMA, et donc sa capacité à absorber du phosphore de la solution du sol. Les sources de phosphore étaient donc organiques et minérales. Finalement, les CMA ont permis d'augmenter la stabilité des agrégats [69], ce qui a pu influencer de manière indirecte la croissance des racines, la porosité du sol, l'activité microbiologique du sol, et donc l'acquisition des nutriments du sol par la plante [52].

L'étude de l'évolution de la diversité au cours du temps pendant la période de culture aurait également pu apporter des informations intéressantes sur la dynamique des populations de CMA (évolution de la diversité d'espèces) dans le sol.

Le développement de modèles génomiques des interactions plante-CMA permettrait une meilleure compréhension et interprétation de tous les facteurs influençant le fonctionnement de ce système hautement complexe. Une fois identifiés les gènes clés régulateurs de la symbiose, l'utilisation des stratégies d'édition de gènes comme les technologies TALEN (Transcription Activator Like Effectors Nucleases), CRISPR-Cas9 (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats) ou encore CRISPR/Cpf5 (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats de *Prevotella* et *Francisella 1*) permettrait de manipuler certains gènes d'intérêt. Cependant, le cadre législatif et éthique doit être pris en compte dans le domaine de ces nouvelles technologies. Il est important de faire remarquer que la mise en place d'approches systémiques est nécessaire afin de développer des stratégies qui prennent en considération l'ensemble des paramètres influençant l'efficacité de la colonisation racinaire par les CMA [7].

Les coûts économiques et environnementaux sur le long terme dus à la pollution des eaux souterraines et à la dégradation des sols, provoqués par l'agriculture intensive n'ont pas été évalués dans le cadre de cette étude. L'entière des bénéfices apportés par la culture des couverts végétaux n'a pas non plus été analysée ici. En effet, il est difficile d'attacher une valeur économique à la protection des ressources environnementales, tout comme il est difficile de contraster les coûts économiques immédiats liés à la culture de couverts végétaux par rapport au potentiel

d'amélioration de la productivité sur le long terme. Une analyse économique a indiqué que les coûts liés à la culture de couverts végétaux sont plus faibles comparés à la gestion des parcelles laissées en jachère pendant l'hiver. Cependant, la gestion durable des pratiques agricoles ne peut être appliquée à grande échelle par les agriculteurs sans la considération attentive des implications pratiques. La barrière la plus importante de remplacement de la jachère hivernale par les couverts végétaux est liée au risque de retard de la mise en place de la culture au printemps suivant [82], [113]. La présentation aux agriculteurs des données prouvant les nombreux effets bénéfiques apportés par les couverts végétaux est essentielle afin de sensibiliser ces derniers à l'utilisation de l'outil efficace que constituent les couverts végétaux dans l'optique du passage progressif vers une dynamique d'agriculture durable. La mise à disposition de ces données, l'accès facilité à l'acquisition de mélanges de graines pour les couverts végétaux ainsi que l'accompagnement et le suivi des agriculteurs sont des éléments clés à mettre en place pour favoriser la transition vers une agriculture respectueuse de l'environnement.

Bibliographie

- [1] P.-L. Alaux, V. César, F. Naveau, S. Cranenbrouck, and S. Declerck. Impact of *Rhizoglyphus irregularis* MUCL 41833 on disease symptoms caused by *Phytophthora infestans* in potato grown under field conditions. *Crop Protection*, 107 :26–33, 2018.
- [2] M. Alexander. Most probable number method for microbial populations. *Methods of Soil Analysis. Part 2. Chemical and Microbiological Properties*, (2) :815–820, 1982.
- [3] M. A. Altieri. The ecological role of biodiversity in agroecosystems. In *Invertebrate Biodiversity as Bioindicators of Sustainable Landscapes*, pages 19–31. Elsevier, 1999.
- [4] J. R. Ambler and J. Young. Techniques for determining root length infected by vesicular-arbuscular mycorrhizae 1. *Soil Science Society of America Journal*, 41(3) :551–556, 1977.
- [5] Z. An, B. Guo, and J. Hendrix. Viability of soilborne spores of glomalean mycorrhizal fungi. *Soil Biology and Biochemistry*, 30(8-9) :1133–1136, 1998.
- [6] H. R. Asghari and T. R. Cavagnaro. Arbuscular mycorrhizas enhance plant interception of leached nutrients. *Functional Plant Biology*, 38(3) :219–226, 2011.
- [7] S. Basu, R. C. Rabara, and S. Negi. Amf : The future prospect for sustainable agriculture. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 102 :36–45, 2018.
- [8] A. Berruti, R. Borriello, A. Orgiazzi, A. C. Barbera, E. Lumini, and V. Bianciotto. Arbuscular mycorrhizal fungi and their value for ecosystem management. In *Biodiversity-The Dynamic Balance of the Planet*. InTech, 2014.
- [9] J. D. Bever. Host-specificity of AM fungal population growth rates can generate feedback on plant growth. *Plant and Soil*, 244(1-2) :281–290, 2002.
- [10] P. Bonfante and I.-A. Anca. Plants, mycorrhizal fungi, and bacteria : A network of interactions. *Annual Review of Microbiology*, 63 :363–83, 2009.
- [11] P. Bonfante and A. Genre. Mechanisms underlying beneficial plant–fungus interactions in mycorrhizal symbiosis. *Nature communications*, 1 :48, 2010.
- [12] D. D. Cameron. Arbuscular mycorrhizal fungi as (agro) ecosystem engineers. *Plant and soil*, 333(1-2) :1–5, 2010.
- [13] T. R. Cavagnaro, S. F. Bender, H. R. Asghari, and M. G. van der Heijden. The role of arbuscular mycorrhizas in reducing soil nutrient loss. *Trends in Plant Science*, 20(5) :283–290, 2015.
- [14] CESAMM. International training on in vitro culture of arbuscular mycorrhizal fungi. complementary session : Root staining. 2018.

- [15] J. P. Clapp, A. Rodriguez, and J. C. Dodd. Glomales rRNA gene diversity-all that glistens is not necessarily glomalean ? *Mycorrhiza*, 12(5) :269–270, 2002.
- [16] J. Constantin, B. Mary, F. Laurent, G. Aubrion, A. Fontaine, P. Kerveillant, and N. Beaudoin. Effects of catch crops, no-till and reduced nitrogen fertilization on nitrogen leaching and balance in three long-term experiments. *Agriculture, ecosystems & environment*, 135(4) :268–278, 2010.
- [17] A. Copus, D. Dos Santos, J. Herbiet, C. Houtet, M. Khalidi, A. Moerenhout, P. Picron, and D. Wouez. Le MAG, dossier CIPAN et anti-dérive. *Protect'eau*, 36, 2017.
- [18] A. Costanzo and P. Bàrberi. Functional agrobiodiversity and agroecosystem services in sustainable wheat production. A review. *Agronomy for Sustainable Development*, 34(2) :327–348, 2014.
- [19] F. Covacevich, H. E. Echeverría, and L. A. Aguirrezabal. Soil available phosphorus status determines indigenous mycorrhizal colonization of field and glasshouse-grown spring wheat from Argentina. *Applied Soil Ecology*, 35(1) :1–9, 2007.
- [20] S. Dabney, J. Delgado, and D. Reeves. Using winter cover crops to improve soil and water quality. *Communications in soil science and plant analysis*, 32(7/8) :1221–1250, 2001.
- [21] T. Daniell, R. Husband, A. Fitter, and J. Young. Molecular diversity of arbuscular mycorrhizal fungi colonising arable crops. *FEMS Microbiology Ecology*, 36(2-3) :203–209, 2001.
- [22] R. Derpsch, T. Friedrich, A. Kassam, and H. Li. Current status of adoption of no-till farming in the world and some of its main benefits. *International Journal of Agricultural and Biological Engineering*, 3(1) :1–25, 2010.
- [23] I. Dickie and R. FitzJohn. Using terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) to identify mycorrhizal fungi : a methods review. *Mycorrhiza*, 17(4) :259–270, 2007.
- [24] D. D. Douds, G. Nagahashi, D. O. Wilson, and J. Moyer. Monitoring the decline in AM fungus populations and efficacy during a long term bare fallow. *Plant and soil*, 342(1-2) :319–326, 2011.
- [25] D. D. Douds Jr, G. Nagahashi, C. Reider, and P. R. Hepperly. Inoculation with arbuscular mycorrhizal fungi increases the yield of potatoes in a high P soil. *Biological agriculture & horticulture*, 25(1) :67–78, 2007.
- [26] B. Drigo, A. S. Pijl, H. Duyts, A. M. Kielak, H. A. Gamper, M. J. Houtekamer, H. T. Boschker, P. L. Bodelier, A. S. Whiteley, J. A. Van Veen, et al. Shifting carbon flow from roots into associated microbial communities in response to elevated atmospheric CO₂. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(24) :10938–10942, 2010.
- [27] D. M. Finney, C. M. White, and J. P. Kaye. Biomass production and carbon/nitrogen ratio influence ecosystem services from cover crop mixtures. *Agronomy Journal*, 108(1) :39–52, 2016.

- [28] J. Gai, G. Feng, X. Cai, P. Christie, and X. Li. A preliminary survey of the arbuscular mycorrhizal status of grassland plants in southern Tibet. *Mycorrhiza*, 16(3) :191–196, 2006.
- [29] A. Gallou, S. Declerck, and S. Cranenbrouck. Transcriptional regulation of defence genes and involvement of the WRKY transcription factor in arbuscular mycorrhizal potato root colonization. *Functional & integrative genomics*, 12(1) :183–198, 2012.
- [30] L. Galvez, D. Douds, L. Drinkwater, and P. Wagoner. Effect of tillage and farming system upon VAM fungus populations and mycorrhizas and nutrient uptake of maize. *Plant and Soil*, 228(2) :299–308, 2001.
- [31] L. Galvez, D. Douds, P. Wagoner, L. Longnecker, L. Drinkwater, and R. Janke. An overwintering cover crop increases inoculum of VAM fungi in agricultural soil. *American Journal of Alternative Agriculture*, 10(4) :152–156, 1995.
- [32] J. Gerdemann. Vesicular-arbuscular mycorrhizae, 1975.
- [33] S. Gianinazzi, A. Gollotte, M.-N. Binet, D. van Tuinen, D. Redecker, and D. Wipf. Agroecology : the key role of arbuscular mycorrhizas in ecosystem services. *Mycorrhiza*, 20(8) :519–530, 2010.
- [34] M. Giovannetti, C. Sbrana, L. Avio, and P. Strani. Patterns of below-ground plant inter-connections established by means of arbuscular mycorrhizal networks. *New Phytologist*, 164(1) :175–181, 2004.
- [35] P. Gosling, A. Hodge, G. Goodlass, and G. Bending. Arbuscular mycorrhizal fungi and organic farming. *Agriculture, ecosystems & environment*, 113(1-4) :17–35, 2006.
- [36] H. Halvorson and N. Ziegler. Application of statistics to problems in bacteriology : I. A means of determining bacterial population by the dilution method. *Journal of Bacteriology*, 25(2) :101, 1933.
- [37] J. L. Harley and E. Harley. A check-list of mycorrhiza in the British flora. *New Phytologist*, 105 :1–102, 1987.
- [38] M. M. Hart and R. J. Reader. Taxonomic basis for variation in the colonization strategy of arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytologist*, 153(2) :335–344, 2002.
- [39] N. L. Hartwig and H. U. Ammon. Cover crops and living mulches. *Weed science*, 50(6) :688–699, 2002.
- [40] S. Hayek, R. Grosch, V. Gianinazzi-Pearson, and P. Franken. Bioprotection and alternative fertilisation of petunia using mycorrhiza in a soilless production system. *Agronomy for sustainable development*, 32(3) :765–771, 2012.
- [41] T. Helgason, J. W. Merryweather, J. P. W. Young, and A. H. Fitter. Specificity and resilience in the arbuscular mycorrhizal fungi of a natural woodland community. *Journal of Ecology*, 95(4) :623–630, 2007.
- [42] D. Heymans. Influence de la composition spécifique de couverts végétaux sur les paramètres physiques, chimiques et biologiques du système sol-plante : Étude des racines. 2018.

- [43] I. Hiiesalu, M. Pärtel, J. Davison, P. Gerhold, M. Metsis, M. Moora, M. Öpik, M. Vasar, M. Zobel, and S. D. Wilson. Species richness of arbuscular mycorrhizal fungi : associations with grassland plant richness and biomass. *New Phytologist*, 203(1) :233–244, 2014.
- [44] M. Hijri. Analysis of a large dataset of mycorrhiza inoculation field trials on potato shows highly significant increases in yield. *Mycorrhiza*, 26(3) :209–214, 2016.
- [45] D. U. Hooper. The role of complementarity and competition in ecosystem responses to variation in plant diversity. *Ecology*, 79(2) :704–719, 1998.
- [46] J. Jansa, F. A. Smith, and S. E. Smith. Are there benefits of simultaneous root colonization by different arbuscular mycorrhizal fungi? *New Phytologist*, 177(3) :779–789, 2008.
- [47] B. Jarvis, C. Wilrich, and P.-T. Wilrich. Reconsideration of the derivation of most probable numbers, their standard deviations, confidence bounds and rarity values. *Journal of applied microbiology*, 109(5) :1660–1667, 2010.
- [48] D. Johnson, P. J. Vandenkoornhuyse, J. R. Leake, L. Gilbert, R. E. Booth, J. P. Grime, J. P. W. Young, and D. J. Read. Plant communities affect arbuscular mycorrhizal fungal diversity and community composition in grassland microcosms. *New phytologist*, 161(2) :503–515, 2004.
- [49] D. L. Jones, C. Nguyen, and R. D. Finlay. Carbon flow in the rhizosphere : carbon trading at the soil–root interface. *Plant and Soil*, 321(1-2) :5–33, 2009.
- [50] Z. Kabir. Tillage or no-tillage : impact on mycorrhizae. *Canadian Journal of Plant Science*, 85(1) :23–29, 2005.
- [51] Z. Kabir and R. Koide. The effect of dandelion or a cover crop on mycorrhiza inoculum potential, soil aggregation and yield of maize. *Agriculture, ecosystems & environment*, 78(2) :167–174, 2000.
- [52] Z. Kabir and R. Koide. Effect of autumn and winter mycorrhizal cover crops on soil properties, nutrient uptake and yield of sweet corn in Pennsylvania, USA. *Plant and soil*, 238(2) :205–215, 2002.
- [53] K. Katoh and D. M. Standley. MAFFT multiple sequence alignment software version 7 : improvements in performance and usability. *Molecular biology and evolution*, 30(4) :772–780, 2013.
- [54] J. A. Keuskamp, B. J. Dingemans, T. Lehtinen, J. M. Sarneel, and M. M. Hefting. Tea bag index : a novel approach to collect uniform decomposition data across ecosystems. *Methods in Ecology and Evolution*, 4(11) :1070–1075, 2013.
- [55] S. N. Kivlin, C. V. Hawkes, and K. K. Treseder. Global diversity and distribution of arbuscular mycorrhizal fungi. *Soil Biology and Biochemistry*, 43(11) :2294–2303, 2011.
- [56] R. T. Koide and M. S. Peoples. On the nature of temporary yield loss in maize following canola. *Plant and Soil*, 360(1-2) :259–269, 2012.
- [57] M. Krüger, C. Krüger, C. Walker, H. Stockinger, and A. Schüßler. Phylogenetic reference data for systematics and phylotaxonomy of arbuscular mycorrhizal fungi from phylum to species level. *New phytologist*, 193(4) :970–984, 2012.

- [58] M. Krüger, H. Stockinger, C. Krüger, and A. Schußler. DNA-based species level detection of Glomeromycota : one PCR primer set for all arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytologist*, 183(1) :212–223, 2009.
- [59] C. Kuszala and S. Gianinazzi. Méthode simple pour évaluer le potentiel endomycorhizogène d'un inoculum. 2010.
- [60] W. Laatsch. Die Festlegung der Phosphorsäure an Tone. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 23(1-2) :17–31, 1941.
- [61] R. M. Lehman, W. I. Taheri, S. L. Osborne, J. S. Buyer, and D. D. Douds Jr. Fall cover cropping can increase arbuscular mycorrhizae in soils supporting intensive agricultural production. *Applied Soil Ecology*, 61 :300–304, 2012.
- [62] LI-COR, Inc. LI-3100C Area Meter. https://www.licor.com/env/products/leaf_area/LI-3100C//, 2018. [Online : consulté le 03-Juin-2018].
- [63] R. Linderman. Mycorrhizal interactions with the rhizosphere microflora : the mycorrhizosphere effect. *Phytopathology*, 78(3) :366–371, 1988.
- [64] P. Loján, C. Senés-Guerrero, J. P. Suárez, P. Kromann, A. Schüßler, and S. Declerck. Potato field-inoculation in Ecuador with *Rhizophagus irregularis* : no impact on growth performance and associated arbuscular mycorrhizal fungal communities. *Symbiosis*, 73(1) :45–56, 2017.
- [65] D. Malloch, K. Pirozynski, and P. Raven. Ecological and evolutionary significance of mycorrhizal symbioses in vascular plants (a review). *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 77(4) :2113–2118, 1980.
- [66] L. Manoharan, N. P. Rosenstock, A. Williams, and K. Hedlund. Agricultural management practices influence AMF diversity and community composition with cascading effects on plant productivity. *Applied soil ecology*, 115 :53–59, 2017.
- [67] N. Mathimaran, R. Ruh, P. Vullioud, E. Frossard, and J. Jansa. *Glomus intraradices* dominates arbuscular mycorrhizal communities in a heavy textured agricultural soil. *Mycorrhiza*, 16(1) :61–66, 2005.
- [68] T. McGonigle, M. Miller, D. Evans, G. Fairchild, and J. Swan. A new method which gives an objective measure of colonization of roots by vesicular—arbuscular mycorrhizal fungi. *New phytologist*, 115(3) :495–501, 1990.
- [69] R. Miller and J. Jastrow. The role of mycorrhizal fungi in soil conservation. *Mycorrhizae in sustainable agriculture*, (mycorrhizaeinsu) :29–44, 1992.
- [70] E. M. Njeru, L. Avio, C. Sbrana, A. Turrini, G. Bocci, P. Bàrberi, and M. Giovannetti. First evidence for a major cover crop effect on arbuscular mycorrhizal fungi and organic maize growth. *Agronomy for Sustainable Development*, 34(4) :841–848, 2014.
- [71] F. Oehl, E. Sieverding, K. Ineichen, P. Mäder, T. Boller, and A. Wiemken. Impact of land use intensity on the species diversity of arbuscular mycorrhizal fungi in agroecosystems of Central Europe. *Applied and environmental microbiology*, 69(5) :2816–2824, 2003.

- [72] F. Oehl, E. Sieverding, P. Mäder, D. Dubois, K. Ineichen, T. Boller, and A. Wiemken. Impact of long-term conventional and organic farming on the diversity of arbuscular mycorrhizal fungi. *Oecologia*, 138(4) :574–583, 2004.
- [73] S. R. Olsen. *Estimation of available phosphorus in soils by extraction with sodium bicarbonate*. United States Department Of Agriculture ; Washington, 1954.
- [74] M. Öpik, A. Vanatoa, E. Vanatoa, M. Moora, J. Davison, J. Kalwij, Ü. Reier, and M. Zobel. The online database MaarjAM reveals global and ecosystemic distribution patterns in arbuscular mycorrhizal fungi (Glomeromycota). *New Phytologist*, 188(1) :223–241, 2010.
- [75] M. Parniske. Arbuscular mycorrhiza : the mother of plant root endosymbioses. *Nature Reviews Microbiology*, 6(10) :763, 2008.
- [76] S. Pellerin, A. Mollier, C. Morel, and C. Plenchette. Effect of incorporation of *Brassica napus* L. residues in soils on mycorrhizal fungus colonisation of roots and phosphorus uptake by maize (*Zea mays* L.). *European Journal of Agronomy*, 26(2) :113–120, 2007.
- [77] R. L. Peterson, H. B. Massicotte, and L. H. Melville. *Mycorrhizas : anatomy and cell biology*. NRC Research Press, 2004.
- [78] M. Peyret-Guzzon, H. Stockinger, M.-L. Bouffaud, P. Farcy, D. Wipf, and D. Redecker. Arbuscular mycorrhizal fungal communities and *Rhizophagus irregularis* populations shift in response to short-term ploughing and fertilisation in a buffer strip. *Mycorrhiza*, 26(1) :33–46, 2016.
- [79] M. J. Pozo and C. Azcón-Aguilar. Unraveling mycorrhiza-induced resistance. *Current opinion in plant biology*, 10(4) :393–398, 2007.
- [80] PROTECT’eau asbl. Protect’eau. <https://protecteau.be/fr>, 2018. [Online : consulté le 30-Mai-2018].
- [81] S. Purin and J. B. Morton. In situ analysis of anastomosis in representative genera of arbuscular mycorrhizal fungi. *Mycorrhiza*, 21(6) :505–514, 2011.
- [82] K. N. Reddy, R. M. Zablotowicz, M. A. Locke, and C. H. Koger. Cover crop, tillage, and herbicide effects on weeds, soil properties, microbial populations, and soybean yield. *Weed Science*, 51(6) :987–994, 2003.
- [83] D. Redecker, R. Kodner, and L. E. Graham. Glomalean fungi from the Ordovician. *Science*, 289(5486) :1920–1921, 2000.
- [84] Regenacterre. Regenacterre. <https://www.regenacterre.be/>, 2016. [Online : consulté le 31-Mai-2018].
- [85] E. B. Roberson, M. K. Firestone, et al. Cover crop management of polysaccharide-mediated aggregation in an orchard soil. *Soil science society of America Journal*, 55(3) :734–739, 1991.
- [86] S. Saif. The influence of soil aeration on the efficiency of vesicular-arbuscular mycorrhizas. *New phytologist*, 95(3) :405–417, 1983.
- [87] A. Schüßler. Glomeromycota species list. http://www.amf-phylogeny.com/amphylo_species.html, 2018. [Online : consulté le 16-Juin-2018].

- [88] A. Schüßler, D. Schwarzott, and C. Walker. A new fungal phylum, the Glomeromycota : phylogeny and evolution. *Mycological research*, 105(12) :1413–1421, 2001.
- [89] A. Schüßler and C. Walker. The Glomeromycota : a species list with new families and new genera. *The Royal Botanic Garden Kew, Botanische Staatssammlung Munich, and Oregon State University*, 19, 2010.
- [90] Z. A. Siddiqui and J. Pichtel. Mycorrhizae : an overview. In *Mycorrhizae : Sustainable Agriculture and Forestry*, pages 1–35. Springer, 2008.
- [91] L. Simon, J. Bousquet, R. C. Lévesque, and M. Lalonde. Origin and diversification of endomycorrhizal fungi and coincidence with vascular land plants. *Nature*, 363(6424) :67, 1993.
- [92] S. E. Smith and D. J. Read. *Mycorrhizal symbiosis*. Academic press, 2010.
- [93] A. Stamatakis, P. Hoover, and J. Rougemont. A rapid bootstrap algorithm for the RAxML web servers. *Systematic biology*, 57(5) :758–771, 2008.
- [94] K. Tawaraya. Arbuscular mycorrhizal dependency of different plant species and cultivars. *Soil Science and Plant Nutrition*, 49(5) :655–668, 2003.
- [95] Tea Bag Index. The project. <http://www.teatime4science.org/about/the-project/>, 2016. [Online : consulté le 07-Juin-2018].
- [96] J. R. Teasdale. Contribution of cover crops to weed management in sustainable agricultural systems. *Journal of Production Agriculture*, 9(4) :475–479, 1996.
- [97] F. Thomas, M. Archambeaud, D. Soltner, and M. Griffon. *Les couverts végétaux : gestion pratique de l'interculture*. Éd. France Agricole, 2013.
- [98] J. Tisdall. Possible role of soil microorganisms in aggregation in soils. *Plant and soil*, 159(1) :115–121, 1994.
- [99] I. Tommerup and L. Abbott. Prolonged survival and viability of VA mycorrhizal hyphae after root death. *Soil Biology and Biochemistry*, 13(5) :431–433, 1981.
- [100] J. M. Trappe. AB Frank and mycorrhizae : the challenge to evolutionary and ecologic theory. *Mycorrhiza*, 15(4) :277–281, 2005.
- [101] M. G. Van der Heijden, J. N. Klironomos, M. Ursic, P. Moutoglis, R. Streitwolf-Engel, T. Boller, A. Wiemken, and I. R. Sanders. Mycorrhizal fungal diversity determines plant biodiversity, ecosystem variability and productivity. *Nature*, 396(6706) :69, 1998.
- [102] P. Vandenkoornhuyse, K. Ridgway, I. Watson, A. Fitter, and J. Young. Co-existing grass species have distinctive arbuscular mycorrhizal communities. *Molecular Ecology*, 12(11) :3085–3095, 2003.
- [103] E. Verbruggen, W. F. Röling, H. A. Gamper, G. A. Kowalchuk, H. A. Verhoef, and M. G. van der Heijden. Positive effects of organic farming on below-ground mutualists : large-scale comparison of mycorrhizal fungal communities in agricultural soils. *New Phytologist*, 186(4) :968–979, 2010.

- [104] S. D. Veresoglou, B. Chen, and M. C. Rillig. Arbuscular mycorrhiza and soil nitrogen cycling. *Soil Biology and Biochemistry*, 46 :53–62, 2012.
- [105] C. Walker and J. M. Trappe. Names and epithets in the Glomales and Endogonales. *Mycological Research*, 97(3) :339–344, 1993.
- [106] B. Wang and Y.-L. Qiu. Phylogenetic distribution and evolution of mycorrhizas in land plants. *Mycorrhiza*, 16(5) :299–363, 2006.
- [107] Y. Y. Wang, M. Vestberg, C. Walker, T. Hurme, X. Zhang, and K. Lindström. Diversity and infectivity of arbuscular mycorrhizal fungi in agricultural soils of the Sichuan province of mainland China. *Mycorrhiza*, 18(2) :59–68, 2008.
- [108] R. Weil and A. Kremen. Thinking across and beyond disciplines to make cover crops pay. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 87(4) :551–557, 2007.
- [109] S. M. Williams and R. R. Weil. Crop cover root channels may alleviate soil compaction effects on soybean crop. *Soil Science Society of America Journal*, 68(4) :1403–1409, 2004.
- [110] R. Wood, M. Lenzen, C. Dey, and S. Lundie. A comparative study of some environmental impacts of conventional and organic farming in Australia. *Agricultural systems*, 89(2-3) :324–348, 2006.
- [111] S. F. Wright and A. Upadhyaya. Extraction of an abundant and unusual protein from soil and comparison with hyphal protein of arbuscular mycorrhizal fungi. *Soil science*, 161(9) :575–586, 1996.
- [112] S. Wu, Z. Cao, Z. Li, K. Cheung, and M. Wong. Effects of biofertilizer containing N-fixer, P and K solubilizers and AM fungi on maize growth : a greenhouse trial. *Geoderma*, 125(1-2) :155–166, 2005.
- [113] L. Wyland, L. Jackson, W. Chaney, K. Klonsky, S. Koike, and B. Kimple. Winter cover crops in a vegetable cropping system : Impacts on nitrate leaching, soil water, crop yield, pests and management costs. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 59(1-2) :1–17, 1996.
- [114] D. Xiang, E. Verbruggen, Y. Hu, S. D. Veresoglou, M. C. Rillig, W. Zhou, T. Xu, H. Li, Z. Hao, Y. Chen, et al. Land use influences arbuscular mycorrhizal fungal communities in the farming–pastoral ecotone of northern China. *New Phytologist*, 204(4) :968–978, 2014.
- [115] C. Yin, N. Mueth, S. Hulbert, D. Schlatter, T. C. Paulitz, K. Schroeder, A. Prescott, and A. Dhingra. Bacterial communities on wheat grown under long-term conventional tillage and no-till in the pacific northwest of the United States. *Phytobiomes*, 1(2) :83–90, 2017.
- [116] W. Zech, N. Senesi, G. Guggenberger, K. Kaiser, J. Lehmann, T. M. Miano, A. Miltner, and G. Schroth. Factors controlling humification and mineralization of soil organic matter in the tropics. *Geoderma*, 79(1-4) :117–161, 1997.

Influence de la composition spécifique de couverts végétaux sur les paramètres physiques, chimiques et biologiques du système sol-plante : étude des champignons mycorhiziens à arbuscules

Présenté par : Isaure Lohest

Les services écosystémiques sont les bénéfices apportés par les écosystèmes à la société, comme la production d'aliments et d'énergie, l'amélioration de la qualité de l'eau et des sols, l'équilibre des cycles des nutriments, etc. (Millennium Ecosystem Assessment, 2005). Afin de répondre aux besoins d'une population en croissance constante, il est important de favoriser la production de services écosystémiques par les agroécosystèmes tout en minimisant la dégradation environnementale. Les couverts végétaux constituent un moyen permettant de répondre à cette nécessité.

Les couverts végétaux sont utilisés afin de ne pas laisser le sol à nu pendant la période séparant deux cultures de rente. Ces derniers sont reconnus comme un élément clé dans la production agricole durable, grâce à leur capacité à améliorer la productivité des écosystèmes cultivés tout en diminuant les impacts négatifs de l'agriculture sur l'environnement. Les couverts végétaux exercent des influences sur les facteurs biotiques (microorganismes du sol, meilleure résistance aux maladies, etc.) et abiotiques (structure et composition chimique des sols, diminution du lessivage des nutriments, etc...). De plus, le non-labour est une pratique agricole complémentaire à la mise en place des couverts végétaux et favorisant la vie du sol.

Ce mémoire analyse l'influence de différents couverts végétaux sur plusieurs paramètres du système sol-plante afin d'évaluer les services écosystémiques fournis par ces derniers. La parcelle expérimentale a été divisée en bandes longitudinales contenant différents traitements (0, 1, 2, 5 et 10 espèces de plantes, semées à deux densités). Ce travail est réalisé en collaboration avec trois autres étudiants analysant chacun différentes parties du système. Cette étude se concentre spécifiquement sur les interactions existant entre les couverts végétaux et les champignons mycorhiziens à arbuscules (CMA). Ces derniers établissent des symbioses avec les racines de la plupart des plantes terrestres et sont fortement influencés par la composition d'espèces de plantes constituant le couvert végétal.

La compréhension des facteurs influençant la composition des communautés de CMA est importante dû au rôle joué par ces microorganismes sur le fonctionnement de l'écosystème. Cette étude a permis de conclure qu'un nombre d'espèces plus important favorise la production de quantités de biomasse supérieures, et donc l'apport de services écosystémiques plus nombreux. Le nombre d'espèces mycotrophes composant un couvert végétal influence positivement la quantité de propagules de CMA dans le sol disponible pour la culture suivante. Les plantes de la famille des Brassicacées influencent négativement les taux de colonisation racinaire. La diversité d'espèces de plantes ne semble pas avoir influencé la diversité d'espèces de CMA. Une étude réalisée sur le long terme pourrait permettre l'observation plus précise de la dynamique des populations de CMA. L'identité des espèces constituant un couvert végétal est donc tout aussi importante que la diversité d'espèces le composant. La combinaison de couverts végétaux avec le non-labour et la minimisation des intrants permet de préserver la communauté de CMA et donc de favoriser une agriculture durable.

Mots-clés : agriculture durable, services écosystémiques, couverts végétaux, diversité de plantes, champignons mycorhiziens à arbuscules