

PRÉALABLE

Lors du séminaire de microscopie que nous avons organisé en Belgique, en mars 2012, nous avons été sensibilisé à ce domaine de la mycologie, par Guy Auderset²⁵. Il avait mis à notre disposition des radicelles d'un cultivar de *Malus sp.*, contenant des endomycorhizes.

Nous avons été immédiatement séduit par ce domaine peu connu, et durant le reste de l'année 2012, nous avons récolté des plantes dans la nature et réalisé des dizaines de préparations microscopiques, tout en conservant soigneusement le matériel étudié, en milieu liquide. Nous vous livrons ci-dessous le premier résultat de nos cogitations actuelles sur ce sujet. Une suite paraîtra dans le prochain bulletin.

Selon des recherches assez récentes, près de 80 % des végétaux (herbacés ou ligneux) abritent des champignons endomycorhiziens, appelés Gloméromycètes, et représentés essentiellement par des espèces du genre *Glomus*. C'est un groupe de champignons très peu connus du public mais écologiquement indispensables.

Les cas les plus répandus sont les endomycorhizes à arbuscules et vésicules (ou arbusculaires). Ce nom évoque les structures hyphales qui se forment à l'intérieur des cellules, et dessinent de petits arbres. Les hyphes pénètrent les parois cellulaires de la plante, sans percer la membrane plasmique, et entretiennent des rapports d'échange très étroits avec le cytoplasme. Certains²⁶ d'entre-eux forment également, dans les cellules de la racine, des organes de stockage appelés vésicules.

Alors que plusieurs centaines de milliers d'espèces de plantes sont concernées, il n'existerait qu'à peine 200 espèces de champignons endomycorhiziens. Ces derniers sont donc peu exigeants dans leur relation de symbiose ; cela implique qu'ils doivent posséder une large diversité génétique et un grand potentiel d'adaptabilité afin de pouvoir s'adapter aux différentes conditions environnementales.

Il faut noter que cette division fongique se reproduit de manière asexuée. Les « spores » se forment à l'extérieur, et parfois à l'intérieur des racines. Parfois, les hyphes d'individus différents peuvent fusionner, ce qui favorise un échange de patrimoine génétique.

Initialement, les Glomérales avaient été placées dans l'ordre des Mucorales, famille des Endogonacées, en raison d'une ressemblance superficielle entre les spores de certaines espèces. Mais les *Endogone sp.* présentent une reproduction sexuée. L'analyse moléculaire a permis d'avancer l'idée d'une origine monophylétique. A l'heure actuelle, différentes écoles s'affrontent sur le sujet, et sur le mode de fonctionnement de ces champignons.

Un site très intéressant à consulter : <http://invam.caf.wvu.edu/index.html> ; INVAM, pour International Culture Collection of Vesicular Arbuscular Mycorrhizal Fungi.

Actuellement, la classe des Gloméromycètes est constituée par les ordres suivants :

Archaeosporales, Diversisporales, Paraglomérales, Gigasporales & Glomérales.

Chaque ordre compte plusieurs familles, parmi lesquelles les *Acaulosporaceae* (*Acaulospora*), *Glomeraceae* (*Glomus*), *Archaeosporaceae* (*Archaeospora*), *Paraglomeraceae* (*Paraglomus*), *Gigasporaceae* (*Gigaspora* & *Scutellospora*) sont les plus communes ... nombre de familles et de genres ne seront pas évoqués ici

GLOMÉRALES

Les arbuscules prennent facilement la coloration (bleu de méthyle, bleu trypan, noir de chlorazol, fuchsine acide). Les hyphes génératrices font de 2 à 6 μm de large, et les ramifications arbusculaires se rétrécissent vers les extrémités. Il arrive que le tronc arbusculaire soit enflé, mais moins que chez les *Gigasporaceae*. Les vésicules se forment en phase terminale, sont +/- abondantes, et sont généralement à parois minces, présentant donc une taille et une forme variables.

Les spores globuleuses de grande taille (entre 100 et 200 μm) se forment en grappes serrées, en général dans le sol (sauf pour les *Glomeraceae* où elles naissent dans les racines), et sont colorées en blanc, rouge foncé ou noir.

Famille des *Glomeraceae* : arbuscules le plus souvent foncés, prenant très bien le bleu coton acétique. Les vésicules elliptiques sont dispersées dans l'ensemble de la mycorhize. A l'intérieur de la racine, les hyphes de colonisation, de 1,5 à 4 μm de diamètre, sont parallèles et réalisent des connexions à angle droit

²⁵ Consultant en microscopie et Chargé de cours à l'Université de Genève, en biologie et physiologie végétale.

²⁶ Selon le dictionnaire, hyphe est un nom du genre masculin, mais il est très souvent utilisé au féminin par nombre d'auteurs.

dites « liaisons H ». Il y a présence d'hyphes extra-racinaires, parfois abondantes et de diamètre variable. Citons *Glomus tortuosum* et *G. clarum*.

Famille des **Acaulosporaceae** : arbuscules prenant faiblement la coloration. Les vésicules, parfois abondantes, de forme irrégulière, se forment très souvent au point d'entrée de l'hyphe dans la racine.

Gigasporaceae

Les arbuscules prennent facilement les mêmes colorants que les *Glomeraceae* ; ils possèdent un tronc large qui se ramifie fortement. Après vieillissement, le tronc reste souvent intact dans les cellules et on observe des amas en forme de bobine, dont la durée de vie n'est pas connue. A l'intérieur des racines, les hyphes sont de largeur et de forme variables. Les spores globuleuses se forment dans le sol, sur des hyphes fertiles extra racinaires ; ces dernières sont de deux types : des hyphes larges et grossières, de 3 à 8 μm de large et des hyphes filiformes, de 1 à 2 μm de diamètre. Elles mesurent plus de 200 μm de diamètre. Même couleurs que chez les *Glomeraceae*. L'extrémité d'une hyphe se gonfle et détermine une cellule sporogène, qui devient finalement une spore.

La paroi sporale est composée de 2 couches possédant chacune des propriétés différentes, qui vont servir à la détermination : couleur, épaisseur, réaction à l'iode.

Ici, il n'y a pas formation de vésicules, mais de cellules auxiliaires, à l'extérieur des radicelles. Ces cellules, à paroi mince et fragile, se présentent souvent en grappes et se forment très tôt, dès le début de la mycorhize, avant la sporulation. Elles semblent jouer un rôle transitoire de stockage du carbone, et emmagasinent les lipides énergétiques.

Les spores des *Gigaspora* ne sont pas ornementées. Chez les *Scutellospora*, il y a présence ou non d'ornementations sporales. Il peut y avoir plusieurs cloisons internes et une structure particulière apparaît : l'écusson de germination.

Voir par exemple :

<http://www.tolweb.org/Glomeromycota>, dont voici une traduction de l'introduction.

« Quoique le Gloméromycètes constituent un groupe de champignons quasiment inconnus pour le grand public, ils sont essentiels pour le fonctionnement des écosystèmes terrestres. Les membres de ce groupe sont des symbiotes mutualistes qui forment des mycorhizes à arbuscules ; ces associations intracellulaires existent dans les racines de la grande majorité des plantes herbacées et des arbres tropicaux. Ce type de symbiose est appelé « mutualiste » parce que la plante champignon et l'hôte profitent à la fois des avantages de cette association intime. Le symbiote fongique reçoit en échange des hydrates de carbone provenant de la plante, pour fonctionner comme un système racinaire étendu, améliorant ainsi considérablement l'absorption minérale par les racines des plantes. Bien qu'il existe différents types de mycorhizes, impliquant différents symbiotes fongiques et végétaux, le type de mycorhizes arbusculaires des Gloméromycètes est le plus répandu. Une dizaine de genre sont définis principalement par la morphologie des spores. Récemment, des séquences d'ADN ont également été utilisées pour circonscrire les taxons.

Caractéristiques :

- symbiotes obligatoires
- formation d'arbuscules dans les racines des plantes
- grandes spores multinucléées, cloisonnées
- hyphes non cloisonnées. »

RÉCOLTE DE MATÉRIEL

++ Lors de travaux de jardinage, prélever des radicelles d'arbres, d'arbustes ou de plantes
→ Notez que les Brassicacées (anciennement appelées Crucifères) et les Chénopodiacées ne sont pas symbiotiques, et présentent seulement des poils absorbants.

++ Éviter les sols très riches.

++ En terrain compact, prélever une motte et laver soigneusement à l'eau courante.

++ Placer aussi vite que possible dans l'eau, afin d'éviter le dessèchement.

Glomus sp. chez *Epilobium parviflorum*

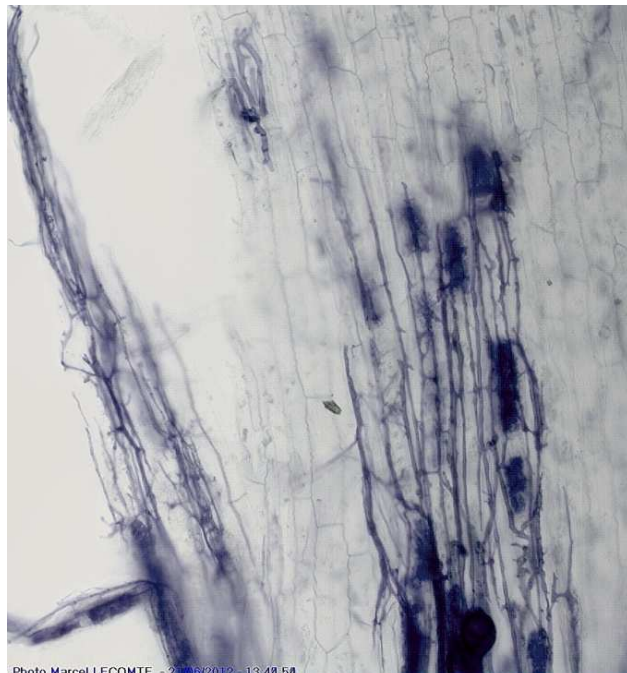


Photo Marcel LECOMTE - 21/05/2012 - 13:44:54

MODE OPÉRATOIRE

++ A l'aide de ciseaux, tailler les racines en petits bouts (1 cm de long au maximum) et ne garder que les radicelles les plus fines.

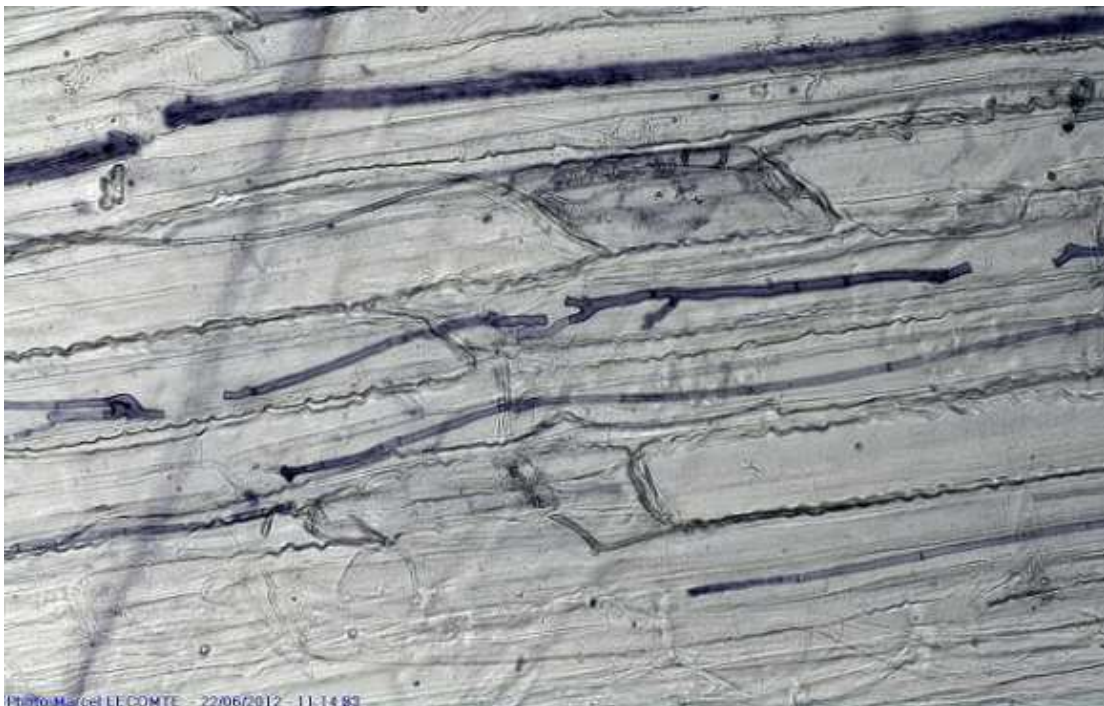
++ Les placer dans un récipient en pyrex, avec de la potasse à 10 % et chauffer au bain-marie à 90°C durant 15 à 30 minutes, selon la fragilité du matériel → le contenu des cellules végétales est détruit et les tanins brunâtres sont éliminés.

++ Jeter la solution qui est devenue brun rougeâtre, en filtrant dans un tamis métallique à mailles fines.

++ Rincer 2 fois de suite à l'eau acétifiée (solution d'acide acétique glacial à 2 %) ou acidifiée (solution d'acide chlorhydrique à 3 %).

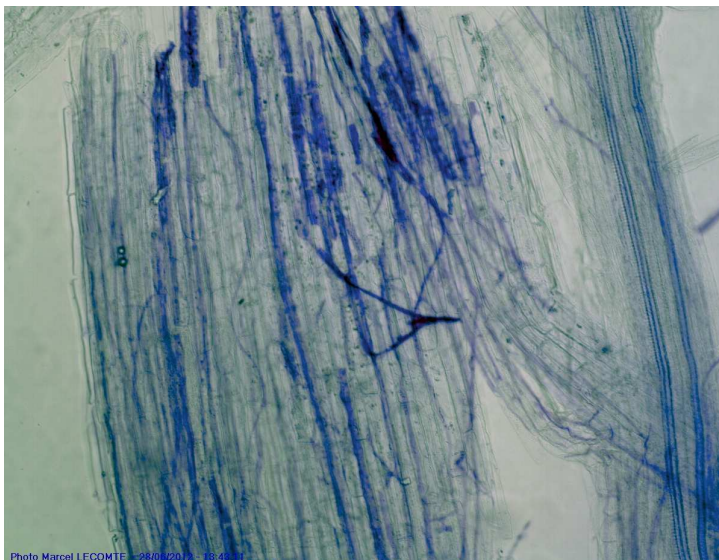
++ Coloration : nous utilisons le bleu coton acétique (eau bidistillée 100 cc - bleu de méthyle 1 g - acide acétique glacial 1 g) ; remettre au bain-marie durant 10-15 minutes. Filtrer au tamis et rincer à l'eau bidistillée.

++ Dissocier et observer à 400x dans l'eau (pour une observation extemporanée) ou dans le lactoglycérol (acide lactique + glycérine + eau bidistillée, en parts égales). Dans le second cas, on peut conserver la préparation durant des années ; il suffit de la luter au vernis à ongles, après avoir mis la préparation sous compression (avec une pince à linge par exemple).



Glomus sp. chez *Malus* sp. (cultivar) ▲

et chez *Plantago major* ▼



Plantes testées à ce jour :

Aconit napel (*Aconitum napellus* ssp. *napellus*) : arbuscules et vésicules.

Bouleau blanc (*Betula pubescens*).

Epilobe à petites fleurs (*Epilobium parviflorum*).

Grande pervenche (*Vinca major*).

Laiteron des champs (*Sonchus arvensis*).

Plantain (*Plantago major*, *P. media*, *P. lanceolata*).

Saule pleureur (*Salix babylonica*).

Trèfle des champs (*Trifolium repens*, *T. arvense*) → chez les Fabacées (appelées aussi Légumineuses ou Papilionacées), on peut aussi observer des nodosités, qui sont des entités permettant à la plante de fixer l'azote atmosphérique (elles résultent d'une symbiose entre des bactéries - les *Rhizobium* - et l'espèce végétale).

BIBLIOGRAPHIE

DODELIN B. & SELOSSE M.A., 2011. *Orchidées et champignons : une porte vers les réseaux mycorhiziens*, Bulletin FMBDS, **202** - 75-83

FORTIN A., PLANCHETTE C. & PICHE Y., 2008 - *Les mycorhizes, la nouvelle révolution verte*, Ed. Quae

GILBERT A., 2011. *Rôle des symbioses endophytes-graminées dans la dynamique et l'adaptation des graminées hôtes*, thèse de doctorat, Institut National Polytechnique de Toulouse, 2011, document pdf

GILBERT A. & SELOSSE M.A., 2011. *Des champignons qui dopent les plantes*, La Recherche, **457** - 72-75

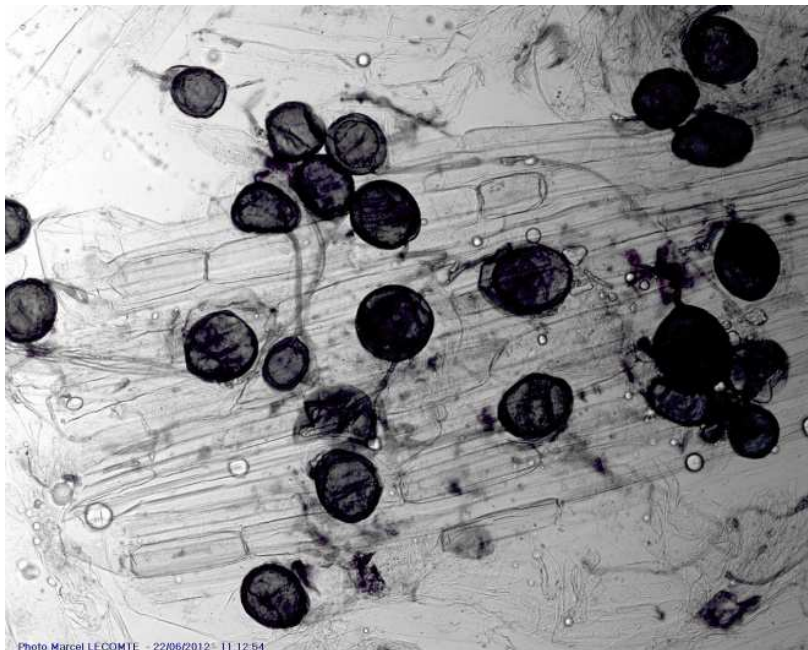
HELME-GUIZON A. & SELOSSE M.A., 2010 - *Coloration des mycorhizes*, Biologie Géologie n°4-2010, document pdf

REDECKER D., 2008 - *Arbuscular mycorrhizal fungi and their relative(s)*, article sur internet

RICHARD F. & SELOSSE M.A., 2007. *Plantes et champignons : l'alliance vitale*, La Recherche, **411** - 58-61

SELOSSE M.A., 2000 - *La symbiose : structures et fonctions, rôle écologique et évolutif*, Vuibert

SELOSSE M.A., 2001 - *La symbiose : ses rôles écologiques et évolutifs*, résumé de la conférence présentée le 3 mars 2001 à la Société des Amis du Muséum National d'Histoire Naturelle, document pdf



Vésicules de *Glomus* sp. chez *Malus* sp. (cultivar)

et chez *Plantago major* ▼

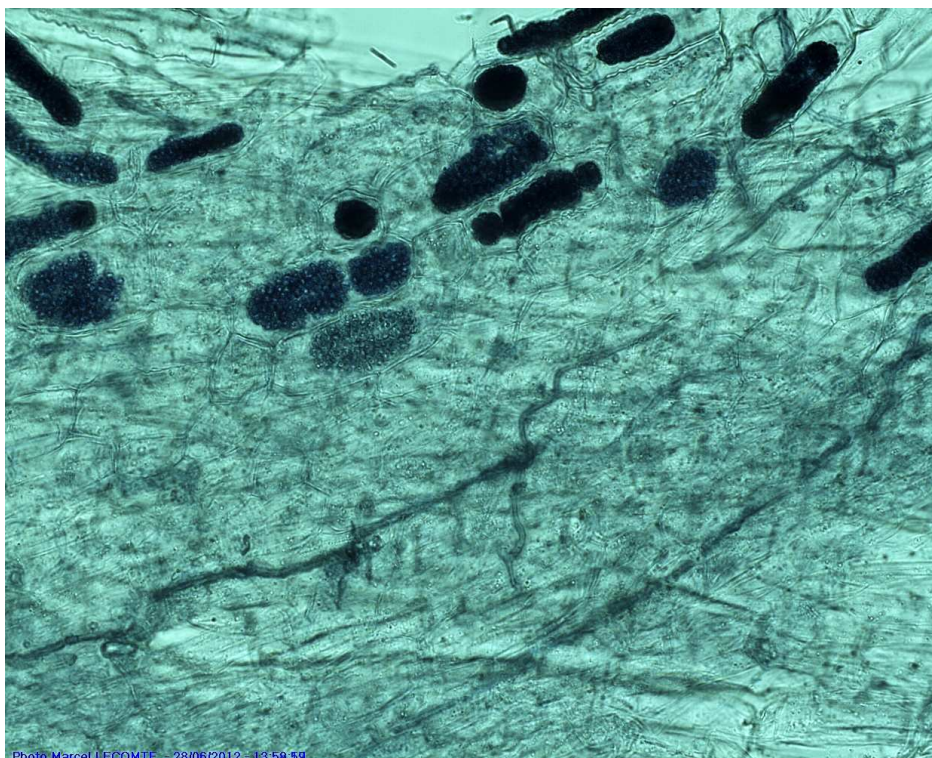
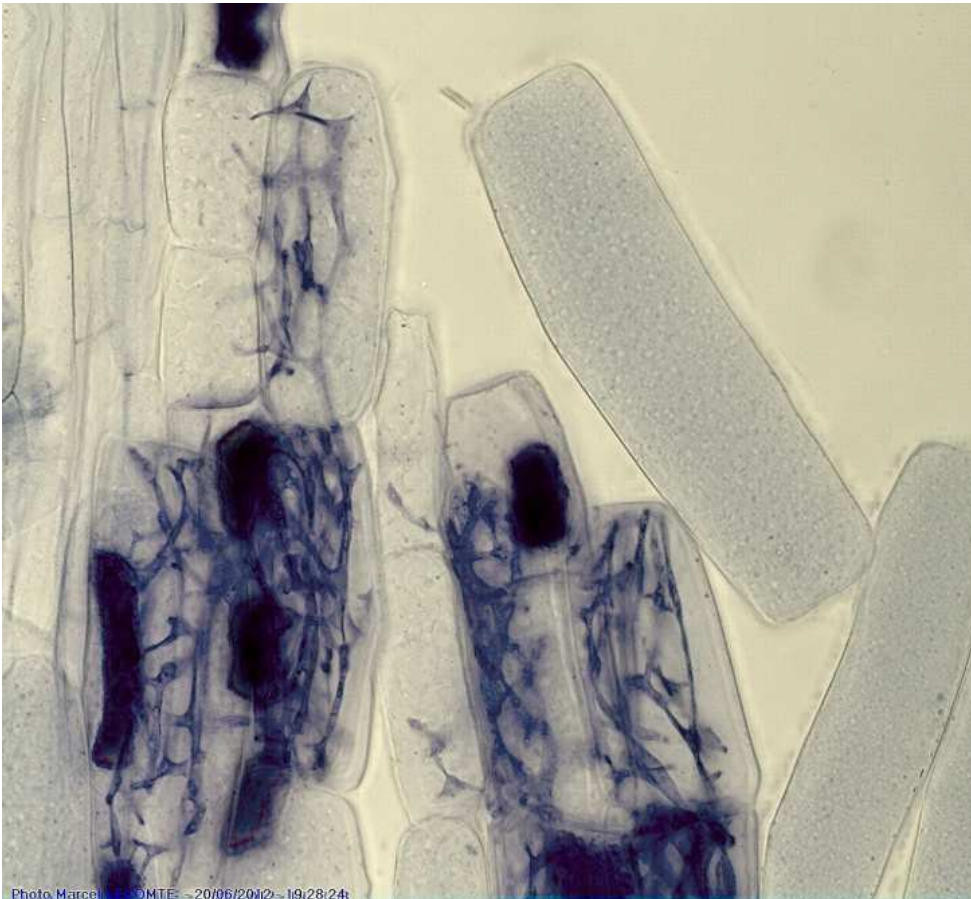


Photo Marcel LECOMTE - 28/06/2012 - 13:58:59



◀ *Sonchus arvensis*

Endomycorhize arbusculaire à vésicules de *Glomus* sp. sur racines d'Aconit napel (*Aconitum napellus* ssp. *napellus*) ▼



Photo: Marcel LECOMTE - 16/06/2012 - 15:28:27



Photo Marcel LECOMTE - 21/06/2012 - 13:46:49

◀ *Glomus* sp. chez *Epilobium parviflorum*

Cette série de photos ne laissent aucun doute quand à la présence de mycélium inter ou intracellulaire, d'arbuscules et de vésicules. Cependant, nous étions inquiets de ne pas rencontrer de spores, alors qu'elles sont de très grande taille (souvent 100 μm de diamètre, et nettement plus).

Il ne fallut pas réfléchir longtemps pour comprendre que la succession de rinçages vigoureux éliminait aussi bien la terre présente, que tout son contenu... et donc les spores.

Notre prochaine étape va consister à repérer ces spores, et les récupérer par filtration au travers de tamis adéquats. Cela fera l'objet d'un prochain article.

Glomus sp. chez *Vinca major* ▼



Photo Marcel LECOMTE - 21/06/2012 - 14:22:15