

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université Hassiba Benbouali de Chlef
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département des Sciences Agronomiques et Biotechnologie



THÈSE

Présentée pour l'obtention du diplôme de
DOCTORAT EN SCIENCES

Spécialité : Sciences Agronomiques

Par
Abdallah NOUI

Thème :

Caractérisation et identification morphologique, biochimique et moléculaire des champignons mycorhiziens de l'arganier dans trois régions de l'Algérie (Tindouf, Mostaganem et Chlef)

Soutenue le **.08../06../2021**, devant le jury composé de :

Benali SETTI	Professeur	Université Hassiba Benbouali de Chlef	Président
Abdelkader SAADI	Professeur	Université Hassiba Benbouali de Chlef	Rapporteur
Ahmed Mohamed Ali BEKADA	Professeur	Université Ahmed Benyahia Tissemsilet	Examineur
Ahmed ADDA	Professeur	Université Ibn Khadlout Tiaret	Examineur
Malika MEZIANE	MCA	Université Hassiba Benbouali de Chlef	Examineur
Nawel SELAMI	MCA	Université des Sciences et Technologies Mohamed Boudiaf, Oran	Examineur

Remerciement

Je tiens tout d'abord à adresser mes sincères remerciements à mon Directeur de thèse **Pr. SAADI Abdelkader** Par son encadrement bienveillant, ses conseils et ses idées, ce travail a pu voir le jour. Grace à ses qualités humaines, il n'a jamais été avare de remonte-moral. Pour lui je témoigne ma gratitude et mon éternelle reconnaissance, les paroles ne peuvent suffire.

Mes remerciements s'adressent également aux membres de jury: **Pr. SETTI Benali**, professeur à l'université de Chlef, qui me fait l'honneur d'être le président de jury de ma thèse. Veuillez trouver ici le témoignage de mon profond respect.

Dr. MEZIANE Malika, Maitre de conférence et à l'université de Chlef, d'avoir accepté de juger ce travail. Recevez ici l'expression de ma profonde reconnaissance pour vos qualités scientifiques et humaines.

Dr. SELLAMI Nawel, Maitre de conférences à l'université des sciences et technologies Mohamed Boudiaf, Oran, d'avoir accepté d'examiner ce travail. Veuillez recevoir mes sincères remerciements.

Pr. ADDA Ahmed, professeur à l'université de Tiaret, d'avoir accepté de consacrer votre temps à cette thèse. Soyez assuré de ma profonde reconnaissance.

Pr. BEKADA Mohamed Ahmed Ali, Professeur au centre universitaire de Tissemsilt, pour avoir accepté la lourde tâche de lire ce manuscrit et d'examiner mon travail.

J'exprime mes vifs remerciements à **Dr. Jan Jansa** Directeur de laboratoire de biologie fongique, Académie des sciences, République Tchèque pour son accueil et toutes ses orientations.

Mes sincères remerciements au **Dr. Rasime Demirel**, Maitre de conférences à l'université technique d'Eskisehir, Turquie, pour son aide.

Mes vifs remerciements aux **Pr. Mahmoudi Hacène** et **Aichouni Ahmed** pour leurs orientations et motivations.

Je remercie également mes parents, ma femme, mes frères, mes sœurs et mes amis pour leurs encouragements et conseils qui m'ont soutenu pendant tous mon cursus académique. Enfin, je voudrais passer mes vifs remerciements et excuses à tous ceux qui m'ont aidé de près ou de loin dans l'élaboration de cette thèse.

Résumé

L'étude vise l'isolement et la caractérisation des champignons mycorhiziens et endophytes associés aux racines d'arganier à travers les techniques morphologiques, biochimiques et moléculaire.

La coloration des racines a montré la présence des champignons mycorhiziens et endophytes dans les trois régions avec une supériorité remarquable au niveau des racines provenant de Tindouf en termes de taux de mycorhization.

Le tamisage humide des sols rhizosphériques a permis l'isolement et la caractérisation morphologique de seize espèces de champignons mycorhiziens appartenant aux cinq genres *Glomus*, *Acaulospora*, *Gigaspora*, *Scutellospora*, *Entrophospora*. L'analyse moléculaire a permis de confirmer l'identification de dix espèces. Le genre *Glomus* est le plus dominant dans les trois régions suivi du genre *Acaulospora*. De plus la région de Mostaganem est la plus riche en termes² de diversité en champignons mycorhiziens suivie de Chlef puis Tindouf.

Quant à la caractérisation biochimique, l'analyse chromatographique des acides gras a permis de détecter l'acide palmitoléique (C16 :1 ω 5) avec des teneurs variables dans les trois régions d'étude. De même le dosage de l'ergostérol a révélé des teneurs variables dans les trois régions.

La mise en culture des racines sur milieu PDA a permis d'isoler et d'identifier quatre espèces endophytes appartenant aux genres *Penicillium* et *Aspergillus*.

L'analyse métagénomique de la communauté fongique endoracinaire, a montré que la majorité des OTU fongiques appartenaient au phylum *Ascomycota* et à *Basidiomycota* avec la dominance du genre *Penicillium* dans les trois régions

Mots clés : Mycorhizes, endophytes, Arganier, *Glomus*, acides gras, ergostérol, ITS

Abstract

The study aims to isolate and characterize mycorrhizal fungi and endophytes associated with argan roots through morphological, biochemical and molecular techniques.

Root staining showed the presence of mycorrhizal and endophytic fungi in all three regions with remarkable superiority in roots from Tindouf in terms of mycorrhization rate.

Wet sieving of rhizospheric soils allowed the isolation and morphological characterization of sixteen species of mycorrhizal fungi belonging to the five genera *Glomus*, *Acaulospora*, *Gigaspora*, *Scutellospora*, *Entrophospora*. Molecular analysis confirmed the identification of ten species. The genus *Glomus* is the most dominant in the three regions followed by the genus *Acaulospora*. In addition, the Mostaganem region is the richest in terms of diversity in mycorrhizal fungi, followed by Chlef then Tindouf.

As for the biochemical characterization, chromatographic analysis of fatty acids detected palmitoleic acid (C16: 1 ω 5) with varying levels in the three study regions. Likewise, the ergosterol assay revealed variable levels in the three regions.

Cultivation of the roots on PDA medium allowed the isolation and identification of four endophytic species belonging to the genera *Penicillium* and *Aspergillus*.

The metagenomic analysis of the fungal community showed that the majority of fungal OTUs belonged to the phylum Ascomycota and Basidiomycota with the dominance of the genus *Penicillium* in all three regions

Key words: Mycorrhizae, endophytes, Argan tree, *Glomus*, fatty acids, ergosterol, ITS

ملخص

تهدف الدراسة إلى عزل وتوصيف الفطريات الميكوريزية و الداخلية المرتبطة بجذور الأركان من خلال تقنيات مورفولوجية وكيميائية حيوية وجزئية.

أظهر تلويح الجذور وجود الفطريات الميكوريزية و الفطريات الداخلية في المناطق الثلاث مع تفوق ملحوظ في الجذور من تندوف من حيث معدل الفطريات.

سمحت الغرلة الرطبة للتربة الجذرية بالعزل والتوصيف المورفولوجي لستة عشر نوعاً من الفطريات الميكوريزية التي تنتمي إلى الأجناس الخمسة *Glomus* و *Acaulospora* و *Gigaspora* و *Scutellospora* و *Entrophospora*. أكد التحليل الجزيئي تحديد عشرة أنواع . جنس *Glomus* هو الأكثر انتشاراً في المناطق الثلاث يليه جنس *Acaulospora* بالإضافة إلى ذلك ، فإن منطقة مستغانم هي الأغنى من حيث التنوع في الفطريات الميكوريزية ، تليها الشلف ثم تندوف.

أما بالنسبة للتوصيف الكيميائي الحيوي ، فقد سمح التحليل الكروماتوغرافي للأحماض الدهنية باكتشاف حمض البالميتوليك (C16: 105) بمستويات مستويات متغيرة في المناطق الثلاث. وبالمثل ، كشف اختبار إرغوستيرول عن مستويات متغيرة في المناطق الثلاث.

مكننا الدراسة من عزل وتحديد أربعة أنواع من النباتات الداخلية تنتمي إلى أجناس *Penicillium* و *Aspergillus*

أظهر التحليل الميتابولومي أن غالبية الفطريات تنتمي إلى فصيلة *Ascomycota* و *Basidiomycota* مع هيمنة جنس *Penicillium* في جميع المناطق الثلاثة

الكلمات المفتاحية: الفطريات الميكوريزية ، الفطريات الداخلية ، شجرة أركان ، *Glomus* ، أحماض دهنية ،

إرغوستيرول ITS,

Abréviations et acronymes

<u>Abréviation</u>	<u>Nom complet</u>
ADN	Acide disoxyribonulcéique
ANOVA	Analyse de variance
APG	<i>Angiosperm Phylogeny Group</i>
ARNr	Acide ribonucléique ribosomique
ARNt	Acide ribonucléique de transfert
CE	Conductivité électrique
CES	Champignons endophytes sebacinales
CMA	Champignons mycorhiziens arbusculaire
CREA	Créatinine Agar
CRSTRA	Centre de recherche scientifiques et technique sur les régions arides
CYA	<i>Czapec yeast extract agar</i>
dNTP	désoxyribonucléoside triphosphate
EBS	Endophytes brunes septées
ECM	Ectomycorhize
EEM	Endoectomycorhize
EMAG	Ester méthylique des acides gras
ERF	Endophytes des racines fines
GC-MS	Chromatographies gazeuse couplé au spectromètre de masse
HDL	Lipoprotéines à haute densité
HPLC	Chromatographie liquide à haute performance
INVAM	International culture collection of arbuscular and Vesicular-Arbuscular Mycorrhizal fungi
ITS	<i>Internal Transcribed Spacer</i>
LDL	Lipoprotéines de basse densité
LSU	<i>Large Subunit</i>
MEA	<i>Malt Extract Agar</i>

MEGA	<i>Molecular Evolutionary Genetics Analysis</i>
NODF	<i>Nestedness metric based on overlap decreasing fill</i>
OTU	Unité taxonomique opérationnelle
pb	pairs de bases
PCR	Réaction de polymérisation en chaîne
PDA	<i>Potato dextrose agar</i>
PVLG	Polyvinil-Lacto-Glycerol
SSU	<i>Small Subunit</i>
USDA	US Department of Agriculture, Agricultural Research Service
Uv-Vis	Ultraviolet-visible

Liste des Figures

<u>Titre</u>	<u>Page</u>
Figure 1 : Structure de la colonisation racinaire par des CMA.....	7
Figure 2 : Classification des CMA proposée par Goto et <i>al.</i> (2012).	8
Figure 3 : Structure de la colonisation racinaire par des ECM	10
Figure 4 : Structure de la colonisation racinaire par les mycorhizes	11
Figure 5 : Structure de la colonisation racinaire par les mycorhizes des orchidées	12
Figure 6 :Structure de la colonisation racinaire par les mycorhizes Ericoïdes.....	13
Figure 7 : Hyphes des endophytes de racines fines (ERF) avec vésicules et en éventail, structures des sporophytes <i>Lycopodiella inundata</i> matures	15
Figure 8 : Représentation schématique de la colonisation des endophytes Sebacinales	16
Figure 9 : Coupe racinaire tachée de <i>Bouteloua gracilis</i> montrant des hyphes internes et extraradicaux.....	17
Figure 10 : Arbre adulte de l'arganier de la région de Stidia (W. Mostaganem).	25
Figure 11 : Aspect des fruits à l'état frais (a) et sec (b), des noyaux (c) et des amandes (d) d'arganier (<i>Argania spinosa</i> (L.) Skeels).....	27
Figure 12 : Aire de répartition de l'Arganier en Algérie	30
Figure 13 : Localisation géographique des zones d'étude	40
Figure 14 : Arbres d'Arganier	42
Figure 15 : Diagramme des textures des sols.....	43
Figure 16 : Echelle d'intensité de colonisation du cortex racinaire	49
Figure 17 : Racines d'arganier mycorhizées présentant des arbuscules (A), des hyphes (H) et des Vésicules (V)	65
Figure 18 : Racine d'Arganier présentant des endophytes.....	65
Figure 19 : Quantification du statut mycorhiziens des racines d'arganier.	68
Figure 20 : Structures des espèces isolées des trois sites d'étude	73
Figure 21 : Abondance relative des genres des CMA isolées.....	74
Figure 22 : Profils chromatographiques des EMAG extraits des racines et des sols rhizosphériques des trois régions.....	78
Figure 23 : Teneur en ergostérol dans échantillons des racines et des sols.....	81
Figure 24 : Electrophorèse des produits de la PCR (NS31-) des dix espèces les plus rencontrés....	84
Figure 25 : Arbre phylogénétique et maximum de vraisemblance des CMA identifiés et quelques souches de référence.	82
Figure 26 : Isolot 01 : <i>AspergillusSydowii</i> ,	86
Figure 27 : Isolot 2 : <i>Aspergillus versicolor</i>	87
Figure 28 :Isolat 2 : <i>Aspergillus ustus</i> A : aspect macroscopique.....	88
Figure 29 : Isolot 02 <i>Penicillium citrinum</i> , A : aspect macroscopique.....	89
Figure 30 : Electrophorèse des produits de la PCR (ITS1F-ITS4) des quatre isolats.....	90
Figure 31 : Arbre phylogénétique et maximum de vraisemblance des isolats endo-racinaires identifiés et quelques souches de référence.....	91
Figure 32 : Electrophorèse des produits de la PCR (ITS1F-ITS4) de l'ADN fongique extrait des racines (effet de la dilution de l'ADN)	93

Figure 33 : Fréquence relative des différents genres fongiques.....	94
Figure 34 : Abondance relative des genres fongiques	95
Figure 35 : Courbe de raréfaction pour toutes les OTU fongiques.. ..	96

Liste des Tableaux

<u>Titre</u>	<u>Page</u>
Tableau 1: Quelques caractéristiques écologiques des trois sites d'étude	41
Tableau 2 : Propriétés physico-chimiques des sols de l'arganier par région.....	63
Tableau 3 : Fréquence d'occurrence (%) des espèces des CMA isolées des trois sites d'étude.....	75
Tableau 4 : Variation du nombre de spores (/100 g du sol) et l'indice de Shanon.....	75
Tableau 5 : Teneur (%) en acides gras extraits des racines et des sols rhizosphériques des trois régions.....	79
Tableau 6 : Comparaison des séquences SSU obtenues avec les séquences de la base de données GenBank (NCBI)	83
Tableau 7 : Comparaison des séquences ITS obtenues avec les séquences de la base de données GenBank (NCBI)	90
Tableau 8 : Résultats des paires d'espèces basés sur les valeurs Z et P	97

TABLE DES MATIERES

Remerciement	II
Résumé	III
Abstract	IV
ملخص	V
Abréviations et acronymes	VI
Liste des figures	IIX
Liste des tableaux	X
Partie 1 : Revue bibliographique	
Introduction.....	1
Chapitre 1 : Symbioses racines-champignons	5
1. Champignons mycorhiziens	5
1.1.Endomycorhizes à arbuscules (CMA)	6
1.2.Ectomycorhizes	8
1.3.Ectendomycorhizes (EEM).....	10
1.4.Les mycorhizes arbutoïdes	10
1.5.mycorhizes des Orchidée	11
1.6.Mycorhizes Ericoïdes.....	12
1.7.Mycorhyzes monotropoïdes	13
1.8. Endophytes des racines fines	14
1.9. Endophytes Sebacinales	15
1.10. Endophytes brunes septées	17
2. Intérêts des symbioses racines-champignons	18
2.1. Amélioration de la nutrition minérale.....	18
2.2. Protection contre les pathogènes	19
2.3. Résistance aux stress abiotiques.....	20
Chapitre 2 : Généralités sur l'Arganier.....	23
1. Aperçu historique	23
2. Classification et description botanique	24
3. Le génome d'arganier	27
4. Répartition géographique.....	28
5. Exigences écologique et édaphiques de l'Arganier	30
6. Intérêts et usages de l'Arganier.....	31
6.1. Intérêts écologiques	31
6.2. Intérêts socio-économiques	32

7.	Utilisations de l'huile d'argan.....	34
7.1.	Utilisation diététique.....	34
7.2.	Utilisation cosmétique.....	35
7.3.	Utilisation en médecine traditionnelle.....	35
8.	Intérêts thérapeutiques de l'huile d'argan	35
8.1.	Dermocosmétique.....	35
8.2.	Prévention des maladies cardiovasculaires	36
8.3.	Prévention des cancers	37

Partie 2 : Etude expérimentale

Chapitre 3 : Matériels et méthodes	40
1. Zones d'étude.....	40
2. Prélèvement des échantillons	42
3. Analyse physico-chimique des sols.....	43
3.1. Analyse granulométrique.....	43
3.2. Mesure du pH.....	44
3.3. Mesure de la conductivité électrique.....	44
3.4. Dosage du carbone totale et la matière organique.....	44
3.5. Dosage de l'azote total.....	45
3.6. Dosage du phosphore assimilable.....	45
3.7. Dosage du calcaire total	46
4. Mise en évidence de la symbiose.....	46
4.1. Eclaircissement.....	47
4.2. Coloration.....	47
4.3. Observation et quantification de la mycorhization.....	47
4.4. Fréquence de mycorhization.....	48
4.5. Intensité de mycorhization.....	48
4.6. Teneur en arbuscules (A %).....	49
5. Etude des champignons associés à <i>Argania spinosa</i>	49
5.1. Etude des champignons mycorhiziens à arbuscules (CMA) à partir du sol.....	49
5.1.1. Extraction des spores de CMA.....	49
5.1.2. Description et identification morpho-anatomique des spores.....	50
5.1.3. Indices écologiques	51
5.1.4. Caractérisation biochimique des CMA.....	51

5.1.5. Caractérisation moléculaire des CMA.....	53
5.2. Caractérisation des champignons à partir des racines.....	55
5.2.1. Isolement des endophytes racinaires.....	55
5.2.2. Identification des isolats fongiques.....	56
5.3. Analyse métagénomique de la communauté fongique endoracinaire	58
5.3.1. Extraction et amplification d'ADN.....	58
5.3.2. PCR nichée des ITS.....	59
5.3.3. Séquençage et analyse bio-informatique.....	60
5.3.4. Analyse des données de la métagénomique.....	60
6. Analyses statistiques.....	61
Chapitre 4 : Résultats et discussions.....	63
1. Les propriétés physico-chimiques des sols.....	63
2. Observation de la colonisation mycorhizienne des racines.....	65
2.1. Quantification de l'association mycorhizienne	67
3. Caractérisations des CMA isolées à partir du sol	69
3.1. Caractérisation morphologiques des spores.....	69
3.1.1. Morphotype 01 (<i>Glomus constrictum</i>)	69
3.1.2. Morphotype 02 (<i>Glomus mosseae</i>).....	70
3.1.3. Morphotype 03 (<i>Glomus clarum</i>).....	70
3.1.4. Morphotype 04 (<i>Glomus versiforme</i>).....	70
3.1.5. Morphotype 05 (<i>Glomus etunicatum</i>).....	70
3.1.6. Morphotype 06 (<i>Glomus intraradices</i>).....	70
3.1.7. Morphotype 07 (<i>Glomus proliferum</i>)	71
3.1.8. Morphotype 08 (<i>Glomus rubiformis</i>)	71
3.1.9. Morphotype 09 (<i>Glomus sp1</i>).....	71
3.1.10. Morphotype 10 (<i>Glomus sp2</i>).....	71
3.1.11. Morphotype 11 (<i>Acaulospora tortuosa</i>)	71
3.1.12. Morphotype 12 (<i>Acaulospora delicata</i>)	72
3.1.13. Morphotype 13 (<i>Acaulospora denticulata</i>).....	72
3.1.14. Morphotype 14 (<i>Gigaspora sp</i>).....	72
3.1.15. Morphotype 15 (<i>Scutellospora sp</i>).....	72
3.1.16. Morphotype 16 (<i>Entrophospora sp</i>).....	72
3.2. Variation quantitative des spores	73
3.3. Quantification biochimique des CMA	78

3.3.1.	Analyse des acides gras	78
3.3.2.	Analyse de l'ergostérol	80
3.4.	Identification moléculaire des CMA	82
4.	Caractérisation des endophytes racinaires.....	85
4.1.	Caractérisation Morphologique des isolats	85
4.1.1.	Isolat 1 : <i>Aspergillus sydowii</i>	85
4.1.2.	Isolat 2 : <i>Aspergillus versicolor</i>	86
4.1.3.	Isolat 3 : <i>Aspergillus ustus</i>	87
4.1.4.	Isolat 4 : <i>penicillium citrinum</i>	88
4.2.	Caractérisation moléculaire des isolats.....	89
5.	Analyse métagénomique de la communauté fongique endoracinaire.....	93
5.1.	Effet de la dilution sur le succès de la PCR.....	93
5.2.	Résultats de l'analyse métagénomiques des communautés fongiques	94
Conclusion et perspectives		102

Références bibliographiques

Annexes

Introduction

Introduction

Les champignons sont une composante importante de l'écosystème et jouent un rôle central dans son fonctionnement tel que le cycle du carbone et des nutriments (Courty *et al.*, 2010 ; Treseder, 2004). Il existe divers groupes fonctionnels de champignons tels : les champignons mycorhiziens, endophytes et pathogènes. Parmi les différents types de symbioses mycorhiziennes, les champignons mycorhiziens à arbuscules (CMA) intéressent la majeure partie des espèces végétales terrestres. Ces CMA interagissent avec diverses espèces végétales et souvent ces interactions, considérées comme mutualistes, sont vitales pour leurs survies et leurs croissances (Finlay, 2008 ; Smith et Read, 2008). Ils confèrent des bénéfices importants aux plantes comme : l'amélioration l'absorption des éléments nutritifs, réduisent l'effet des infections pathogènes des racines, et une meilleure capacité de résister aux conditions environnementales défavorables (Mandyam and Jumpponen, 2005). La symbiose mycorhizienne confère également à la plante une tolérance aux métaux lourds (Leyval & Joner, 2001) et aux polluants organiques (Joner & Leyval, 2003). Les CMA jouent un rôle crucial dans les écosystèmes naturels et agricoles en agissant comme biofertilisants, épurateurs, éléments structurant la matrice du sol, bioprotecteurs et agents de lutte biologique. Aussi, ils présentent un grand potentiel d'application en agriculture, en horticulture, en sylviculture, pour la production de produits alimentaires et de biomasse (Ellouze, 2011).

Les régions arides et semi-arides sont considérées comme des habitats vulnérables pour les micro-organismes, à cause de la rareté de l'eau qui affecte leurs activités, et par voie de conséquence, impacte négativement le fonctionnement de l'écosystème (Austin *et al.*, 2004; Collins *et al.*, 2008). Parmi les espèces végétales vivant dans ces régions au climat extrême et qui nécessitent une symbiose racinaire pour leur bonne croissance, figure l'arganier (*Argania spinosa* L. Skeels) (Nouaim *et al.*, 1994; Nouaim *et al.*, 2002). C'est un arbre sylvestre endémique, appartenant à la famille des Sapotacées (Chaussod *et al.*, 2005). Il est présent dans les régions sud-ouest du Maroc et de l'Algérie (région de Tindouf) (Msanda *et al.*, 2005; Kouidri *et al.*, 2013). L'espèce en question joue un rôle important sur le plan écologique mais aussi sur le plan socio-économique, surtout dans un pays comme le Maroc où les populations de ses arganeraies sont plus importantes en terme de superficie et de densité.

L'arganier est un arbre multi-usage où chacune de ses parties peut être exploitée et valorisée. Les feuilles et les fruits de l'arbre sont utilisés comme source de fourrage pour le bétail, son bois comme combustible et aussi comme matière première en menuiserie. C'est surtout les graines qui sont exploitées pour extraire les huiles, une huile à grande valeur ajoutée. C'est une huile comestible mais est particulièrement employée dans les industries de la cosmétologie et de la pharmacologie (Charrouf & Guillaume, 2009).

Malgré son importance, l'arganier figure malheureusement dans la liste des espèces végétales menacées et/ou en voie de disparition, particulièrement en Algérie. La dégradation de la composition physico-chimique et biologique des sols, l'aridité, la désertification, la surexploitation du bois sont les principales causes de cette perte (Waroux et Lambin, 2012; Alba-Sanchez et al., 2015).

Au Maroc, plusieurs programmes, visant la sauvegarde de cette espèce (création d'aires protégées, programme de sélection), ont été lancés mais les résultats obtenus, demeurent insuffisants, vu l'ampleur de la dégradation. Ces dernières années, des essais de régénération par culture *in vitro* de l'arganier par plantation ont donné des résultats prometteurs (Lamhamedi et al., 2000, Lotmani et al., 2002). Le succès de la transplantation de vitroplants dépend essentiellement de la composition du sol en nutriments et en microorganismes symbiotiques, notamment en champignons (Nouaim et Chaussod, 1994). Plusieurs études ont montré la dépendance de l'arganier à ces champignons dans la croissance et la nutrition minérale de l'arganier (Nouaim et al., 1994; Nouaim et al., 2002 ; Echairi et al., 2008 ; Sellal et al., 2017).

L'exploitation et l'exploration de la communauté fongique des espèces végétales s'avère donc une piste très prolifique pour le développement et la croissance de l'arganier et peut aider à sa préservation. Mais rares sont les études scientifiques qui ont été menées pour caractériser ou identifier la diversité des communautés fongiques, associées aux arganiers. Jusqu'à ce jour, seuls deux auteurs ont publié sur le sujet (Sellal et al., 2016 ; Ouallal et al., 2018). Les études en question ont fait l'objet d'investigations afin, d'une part, d'explorer la diversité des communautés de champignons mycorhiziens associés à cet arbre dans diverses situations édapho-climatiques et, d'autre part, d'évaluer le potentiel mycorhizogène des environnements rhizosphériques. La caractérisation s'est basée essentiellement sur des critères morphologiques des spores.

En Algérie aucune étude portant sur la caractérisation de la diversité des champignons mycorhiziens associés à l'arganeraie algérienne n'a été réalisée. La présente étude est une première contribution répondant à cette préoccupation. Elle s'inscrit dans le cadre d'un projet de recherche à impact socio-économique portant sur la valorisation et la préservation de la communauté microbienne associée à quelques plantes à intérêt médicinal et socioéconomique. L'étude ambitionne d'atteindre les objectifs suivants :

- 1- Isolement et caractérisation morphologique, biochimique et moléculaire des champignons mycorhiziens à arbuscules (CMA) associés à l'arbre d'arganier dans trois régions d'Algérie (Mostaganem, Chlef et Tindouf).
- 2- Evaluation de la diversité de la communauté fongique dans l'espace rhizosphérique de la plante dans trois régions d'Algérie (Mostaganem, Chlef et Tindouf).

Partie I: Revue bibliographique

Chapitre 1

Symbioses racines-champignons

Chapitre 1 : Symbioses racines-champignons

Le terme « *symbiotismus* » a été inventé par Albert Bernhard Frank en 1877 pour décrire la relation mutualiste chez les lichens, tandis que le mot « symbiose » est attribué par Anton de Bary qui, un an plus tard, définissait la symbiose comme «vivre ensemble» (Sapp, 1994; Sapp et *al.*, 2002). Si certains scientifiques ont persisté à penser que la «symbiose» ne devrait être utilisée que pour les relations mutualistes, d'autres ont élargi la définition pour englober les interactions de commensalisme et parasites (Douglas, 2010).

Le débat vieux de 130 ans est maintenant terminé et les manuels actuels de biologie générale et d'écologie utilisent une définition plus large de la symbiose qui inclut tous les types d'interactions possibles, et la définition restrictive (égalisation de la symbiose avec le mutualisme) a pratiquement disparu. La symbiose, dérivé du mot grec ``sym ``: ensemble, et ``biose ``: vivre) est actuellement définie comme tout type de relation écologique proche et à long terme entre deux organismes vivants d'espèces différentes. (Martin et Schwab, 2013).

Dans ce chapitre, nous explorons les symbioses racines-champignons qui sont principalement bénéfiques pour les plantes hôtes.

1. Diversité des champignons mycorhiziens

Le mycorhize est une association symbiotique cruciale entre les racines des plantes et les champignons dans l'environnement du sol. Le terme mycorhize (littéralement «racine de champignon») a été créé par Frank (1885), qui a souligné que ces associations entre les champignons et les plantes sont nécessaires pour la nutrition des deux partenaires (Perru, 2006).

Selon Brundrett (2004), Le mycorhize est une association mutualiste «équilibrée» entre les champignons et les plantes avec un échange mutuellement bénéfique pour la croissance et la survie des deux partenaires.

En général, les champignons mycorrhiziens augmentent la capture de divers nutriments du sol et leur translocation vers la plante hôte. La distribution diffuse du mycélium dans le sol autour des racines atteint des distances plus longues que celles obtenues par les racines non colonisées et offre une plus grande capacité d'absorption des nutriments, en particulier le phosphore (P), l'azote (N) et le potassium (K). De plus, les changements dans l'architecture des racines avec une intensité de ramification plus élevée augmentent la surface de contact avec le sol. Les racines colonisées ont une longévité accrue, une plus grande résistance aux agents pathogènes, aux éléments toxiques du sol et aux conditions extrêmes de température, d'acidité et d'humidité (Clasen et *al.* 2018).

Une gamme très large des espèces végétales, y compris les mousses (Anthoceroophyta, Marchantiophyta et Bryophyta), les fougères (Pteridophyta) et les plantes supérieures (Spermatophyta), est capable d'établir une symbiose avec les champignons de différents taxons (Glomeromycota, Ascomycota ou Basidiomycota) (Smith et Read, 2008a).

1.1. Endomycorhizes à arbuscules (CMA)

La symbiose mycorhizienne arbusculaire est l'une des associations les plus répandues sur terre, fortement impliquée dans la coexistence de différentes espèces dans les différents écosystèmes (Van der Heijden et *al.*, 2015; Mariotte et *al.*, 2018).

Bien que les CMA colonisent généralement les racines, la colonisation des poils racinaires a également été signalée par Guinel et Hirsch (2000). Les hyphes se développent de manière inter et intracellulaire à travers des cellules épidermiques et corticales vivantes, dans lesquelles ils produisent des structures spécialisées en forme de vésicules et d'arbuste appelées arbuscules (figure 1). Ces dernières fournissent une très grande surface de contact pour l'échange de nutriments. Les hyphes traversent les parois cellulaires, mais pas les membranes plasmiques des cellules du cortex (Kariman et *al.*, 2018).

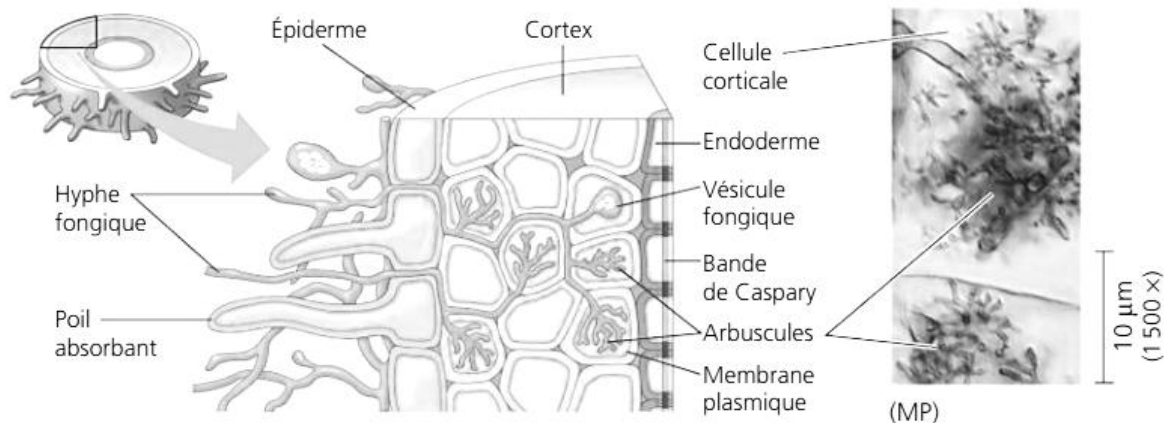


Figure 1 : Structure de la colonisation racinaire par des CMA (Faucher et Lachaine, 2012)

Environ 80% de toutes les espèces de plantes vasculaires établissent une symbiose mycorizienne (Brundrett et Tedersoo, 2018) avec les champignons appartenant au phylum *Glomeromycota* (Smith et Read, 2008a ; Schussler et Walker, 2010).

Le phylum *Glomeromycota* compte environ 284 espèces vivantes décrites à ce jour, réparties en cinq ordres, quatorze familles et vingt-neuf genres (Goto et al. 2012). Avec cette classification, une grande partie des noms scientifiques des espèces a été revue (Kehir et al., 2018, Figure 2).

Les deux ordres les plus fournis en espèces décrites sont les *Diversisporales* et des *Glomerales*. L'ordre des *Diversisporales* (Walker et Schüßler, 2004) regroupe quatre familles différentes.

L'ordre des *Paraglomerales* compte une famille comprenant un seul genre *Paraglomus* (Schüßler et al., 2001, Morton et Redecker, 2001). Ce genre serait le clade qui a divergé en premier selon les études phylogénétiques basées sur l'ADN ribosomal (Redecker et Raab, 2006). Les trois espèces de référence décrites à ce jour forment des spores de petites tailles.

L'ordre des *Archaeosporales* comprend trois familles, incluant quatre genres qui sont nommés : *Archaeospora*, *Ambispora* et *Geosiphon* et *Intraspora*. Au total, cet ordre présente environ une dizaine d'espèces décrites (Walker et al., 2007).

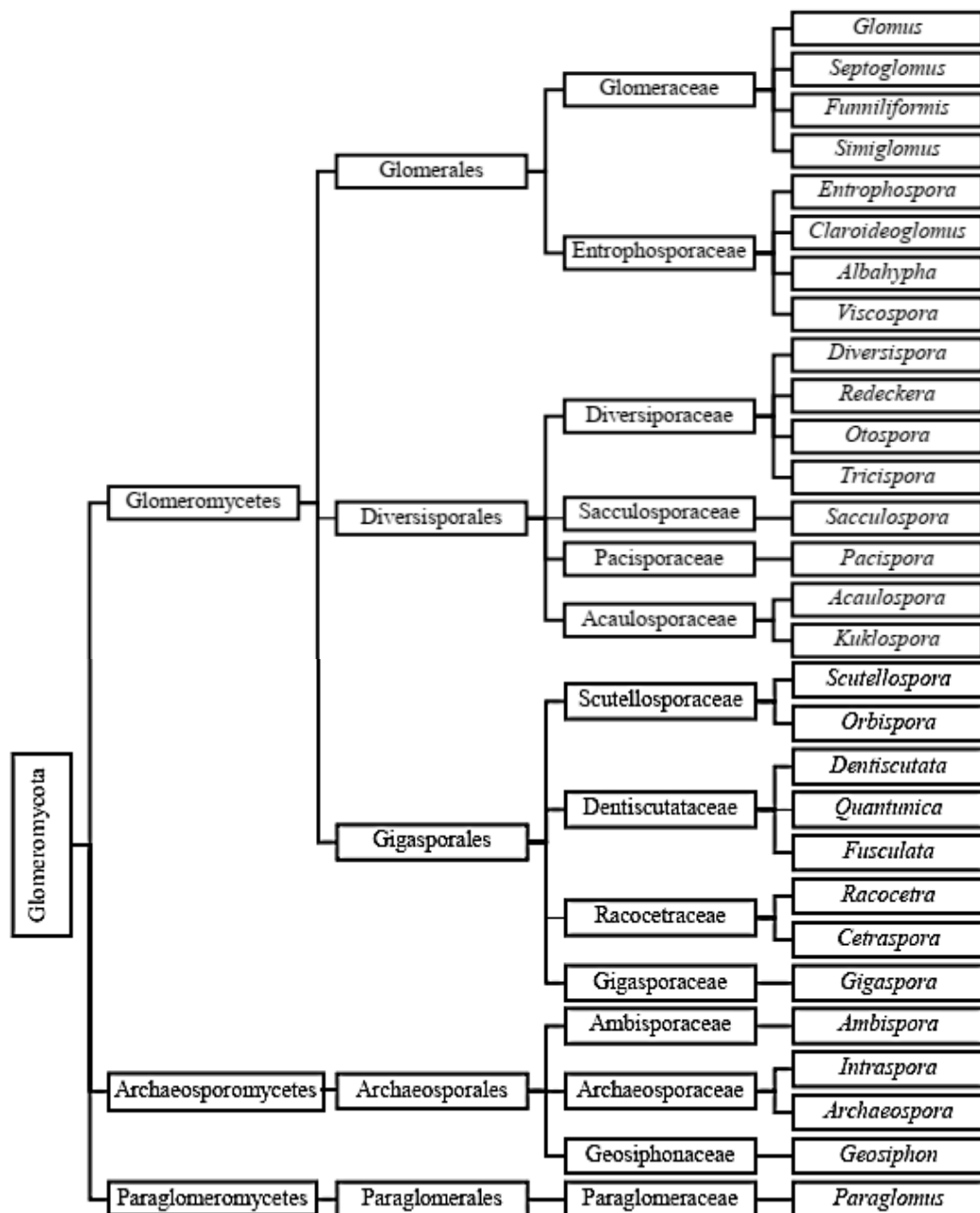


Figure 2: Classification des CMA proposée par Goto et *al.* (2012).

1.2. Ectomycorhizes

Les ectomycorhizes (ECM) sont formés par des champignons infectants les racines d'environ 2% des plantes vasculaires (comprenant principalement des *Pinacées*, des *Fagacées*, des *Diptérocarpacées* et des *Myrtacées*) (Yanjiao et *al.*,2020).

On estime que plus de 5 000 espèces de champignons sont capables de former une symbiose ectomycorhizienne (Clasen et *al.*, 2018).

Les associations ectomycorhiziennes se forment principalement dans les extrémités des racines de la plante hôte, inégalement réparties dans le profil du sol et plus abondantes dans les couches superficielles contenant de la matière organique que dans les couches de sol minéral (Meyer, 1973; Harvey et *al.*, 1976; Andreadza et *al.*, 2008)

Selon Brundrett et *al.* (1996), les formes ectomycorhiziennes dans lesquelles les racines de la plante hôte et les champignons poussent simultanément se trouvent dans des conditions environnementales favorables. La séquence d'événements qui aboutit à la formation d'une association ectomycorhizienne peut être résumée dans les étapes suivantes:

1. Contact avec des hyphes qui reconnaissent et adhèrent aux cellules épidermiques de la racine à proximité des endroits où il y a une activité de croissance dans les jeunes racines latérales.

2. Prolifération du mycélium à la surface de la racine et différenciation pour former le manteau.

3. Les hyphes pénètrent dans les cellules épidermiques (principalement les angiospermes) ou dans le cortex (dans les gymnospermes) pour former le filet de Hartig. La réponse de l'hôte à ces changements peut inclure la production de polyphénols dans les cellules et le dépôt de métabolites secondaires dans les parois cellulaires.

4. Les zones d'activité mycorhizienne se produisent à une certaine distance (mm) de l'extrémité de la racine, mais la sénescence des hyphes du filet de Hartig se produit dans les zones plus anciennes de la racine, les plus éloignées de l'extrémité. Par conséquent, l'activité nette de Hartig dépend de l'âge des racines et de la croissance.

5. Le manteau des racines plus anciennes persiste généralement longtemps après que les associations se sont produites, mais il devient inactif avec le temps. Les racines ectomycorhiziennes plus anciennes fonctionnent probablement comme des propagules et des structures de stockage (figure 3).

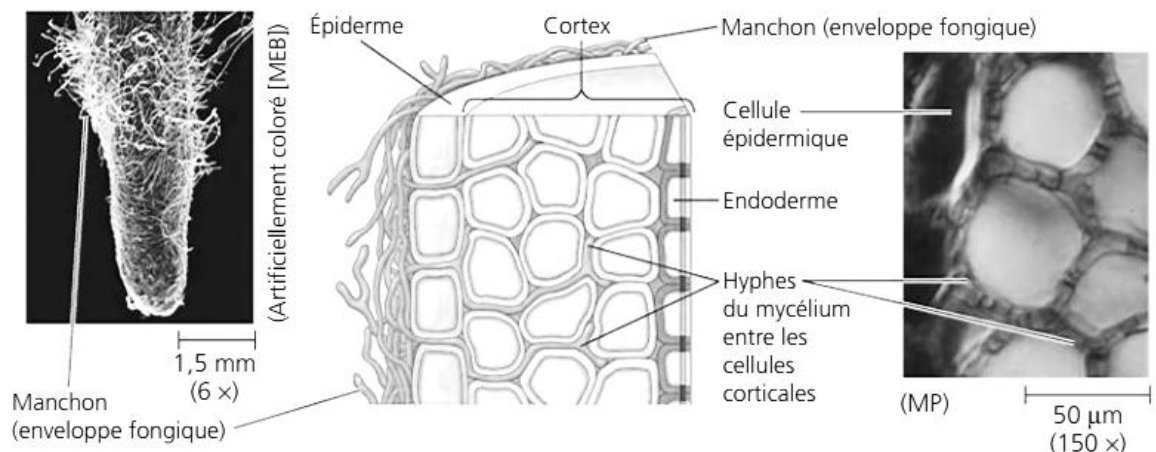


Figure 3 : Structure de la colonisation racinaire par des ECM (Faucher et Lachaine, 2012)

1.3. Ectendomycorhizes (EEM)

Ce type de mycorhize présente à la fois des structures d'ectomycorhizes et des structures d'endomycorhizes (Figure 1 et 2).

Le champignon forme un manteau et un réseau de Hartig intercellulaire rappelant les structures développées par les ECM, mais en plus les hyphes fongiques pénètrent à l'intérieur des cellules épidermiques et corticales comme observé dans la symbiose endomycorhizienne (Dexheimer et Gérard, 1993; Calon, 2016).

Les champignons EEM peuvent hydrolyser des polysaccharides complexes, il a donc été proposé qu'ils soient les fournisseurs de C aux jeunes plants avant le début de leur autotrophisme. La présence d'une symbiose EEM dans les semis se régénérant à partir de forêts de conifères / feuillus brûlées suggère que les champignons EEM peuvent jouer un rôle dans la régénération des sites perturbés et l'établissement de semis de conifères après un incendie (Mikola, 1965; Lobuglio et Wilcox, 1988; Trevor et al., 2001).

1.4. Les mycorhizes arbutoïdes

Les mycorhizes arbutoïdesse trouvent particulièrement chez les genres *Arbutus* et *Arctostaphylos* de la famille des *Ericaceae* (Laurent, 1995; Nakas et Hagedorn, 1990; Smith et Read, 2008a).

Les structures mycorhiziennes sont très similaires à celles des ECM et les espèces fongiques impliquées sont également capables de former des associations ECM, de sorte que l'espèce végétale détermine souvent le type d'association présente dans une zone forestière donnée. Dans ces associations, un manteau d'hyphe recouvre la surface de la racine mais peut être absent, et un filet Hartig est généralement limité aux cellules corticales épidermiques et externes en raison de la présence de dépôts de subérine dans le cortex externe des racines de l'hôte (Münzenberger, 1991). En outre, les hyphes pénètrent également dans les cellules corticales externes et les remplissent de bobines, ce qui est la caractéristique distinctive de la symbiose arbutoïde par rapport à la symbiose ECM (Münzenberger et *al.*, 1992, figure 4).

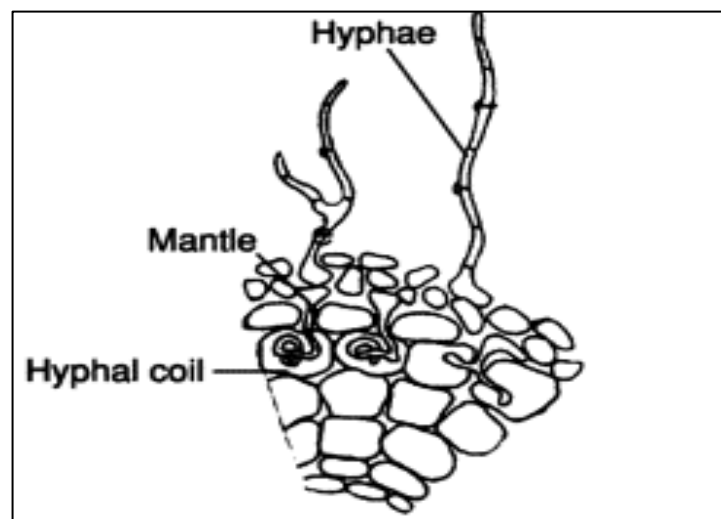


Figure 4 : Structure de la colonisation racinaire par les mycorhizes arbutoïdes (Egerton et *al.*, 2005)

1.5. Mycorhizes des Orchidée

Les orchidées de la famille des plantes Orchidaceae, qui englobe 10% des espèces de plantes vasculaires, établissent une symbiose mycorhizienne (Brundrett et Tedersoo, 2018), avec une variété de basidiomycètes (Kariman et *al.*, 2018), et les champignons ascomycètes (Waterman et *al.*, 2011). Les hyphes fongiques colonisent les poils racinaires nouvellement formés peu après la germination des graines. Les hyphes pénètrent dans les cellules et sont entourés par la membrane plasmique invaginée. Des bobines d'hyphes

grossières (pelotons) se forment à l'intérieur des cellules et augmentent considérablement l'interface entre les deux partenaires (Smith et Read, 2008b ; Egerton et *al.*, 2005 figure 5).

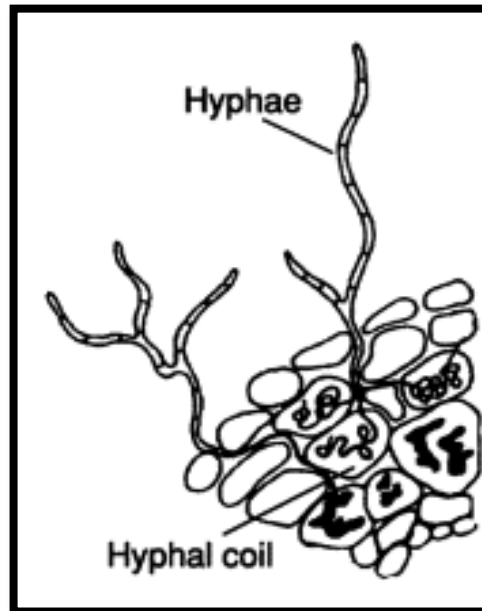


Figure 5 : Structure de la colonisation racinaire par les mycorhizes des orchidées (Egerton et *al.*, 2005)

1.6. Mycorhizes Ericoïdes

Les plantes d'Ericaceae (1,5% des espèces de plantes vasculaires) forment une symbiose Ericoïde avec divers champignons Ascomycètes (Brundrett et Tedersoo, 2018). Les champignons Ericoïdes peuvent former un réseau d'hyphes lâche autour de la surface des racines des cheveux fins. Ils pénètrent dans les cellules épidermiques / corticales (sans pénétrer dans la membrane plasmique) et les remplissent de spires hyphes denses. La colonisation Ericoïde est limitée aux cellules matures, de sorte que la région apicale de la racine reste non colonisée (Egerton et *al.*, 2005, figure 6). L'échange réciproque de C et P a été démontré dans une association Ericoïdes chez plusieurs espèces (Kowal et *al.*, 2018). Les champignons Ericoïdes améliorent la forme physique et l'acquisition de nutriments des plantes Ericaceae dans leurs habitats naturels grâce à la décomposition de composés organiques complexes en sécrétant une large gamme d'enzymes, notamment des cellulases, des protéases, des polyphénol oxydases et des phosphatases (Read et *al.*,

2004 ; Martino et al. , 2018). Ils protègent également les plantes hôtes contre la toxicité des métaux lourds (Perotto et al., 2002) et peuvent jouer un rôle dans la restauration des bruyères éricacées (Diaz et al., 2006; Diaz et al., 2008).

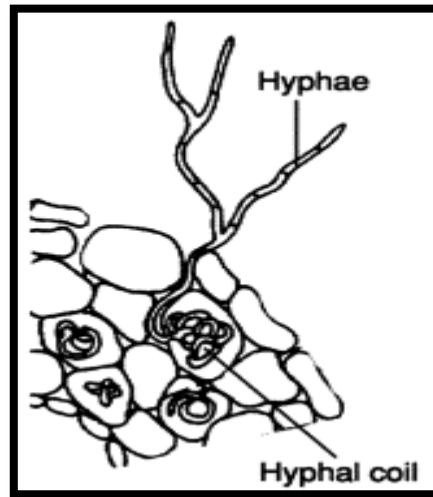


Figure 6 : Structure de la colonisation racinaire par les mycorhizes Ericoïdes (Egerton et al., 2005).

1.7. Mycorhizes monotropoïdes

Les mycorhizes monotropoïdes sont des associations de quelques genres de plantes myco-hétérotrophes de la famille des Ericacées. Ces associations sont caractérisées par une pénétration hypale limitée dans les cellules épidermiques. Des informations sur la structure des associations et l'identité des champignons mycorhiziens chez les genres *Monotropa*, *Pterospora*, *Sarcodes*, etc. sont fournies par Robertson et Robertson (1982), Castellano et Trappe (1985) et Bidartondo et Bruns (2002).

Les plantes hôtes ne contiennent pas de chlorophylle et sont myco-hétérotrophes, c'est-à-dire qu'elles dépendent de leurs partenaires fongiques pour que le carbone provienne de plantes autotrophes voisines telles que *Pinus*, *Picea*, *Fagus*, *Quercus*, *Cedrus* et *Salix* (Tedersoo et al., 2007; Hynson et al., 2013). Les plantes mycohétérotrophes sont considérées comme les seuls exemples sans ambiguïté du phénomène potentiellement très répandu de transfert de carbone de plante à plante via les réseaux hyphes de champignons mycorhiziens (Bidartondo, 2005).

1.8. Endophytes des racines fines

Les endophytes des racines fines (ERF) sont des champignons endophytes racinaires associés à des angiospermes qui ont été traditionnellement classés comme des CMA (*Glomus*) (Crush, 1973; Gianinazzi-Pearson et al., 1981), mais leur position taxonomique a été assez ambiguë (Schussler et Walker, 2010). Jusqu'à récemment, Orchard et al. (2017) ont clarifié la position phylogénétique des ERF et démontré que ces champignons appartiennent à *Mucoromycotina*, et non à *Glomeromycotina*.

Les caractéristiques typiques du ERF comprennent des hyphes fines de moins de 1,5 mm de diamètre, la colonisation intracellulaire des cellules épidermiques et corticales dans un schéma de ramification en éventail et la production de structures en forme d'arbuscules et de vésicules (Gianinazzi-Pearson et al., 1981; Abbott, 1982; Orchard et al., 2017, figure 7). La capacité de *Mucoromycotina* à établir une symbiose avec des plantes terrestres précoces a soulevé l'hypothèse que *Mucoromycotina* pourrait être des prédécesseurs de *Glomeromycotina* (Bidartondo et al., 2011; Hoysted et al., 2018). L'hypothèse est en outre étayée par la relation phylogénétique étroite entre *Mucoromycotina* et les CMA (Lin et al., 2014; Spatafora et al., 2016). Récemment Field et al. (2015) ont démontré une symbiose mutuellement bénéfique entre les hépatiques et *Mucoromycotina* et *Haplomitriopsida* et leur fonction de formation d'arbuscules (Orchard et al., 2017). Une amélioration de la croissance du *Lolium perenne*, du *Dactylis glomerata* et *Anthoxanthum odoratum* associés aux ERF a été observée dans des conditions déficientes en P (Yan et al., 2019). Les ERF peuvent avoir des fonctions écologiques importantes chez les plantes exposées à des stress abiotiques en raison de leur présence omniprésente dans des conditions environnementales extrêmes telles que la haute altitude, l'acidité du sol, les températures froides et l'engorgement (Postma et al., 2007 ; Newsham et al., 2009; Orchard et al., 2017).

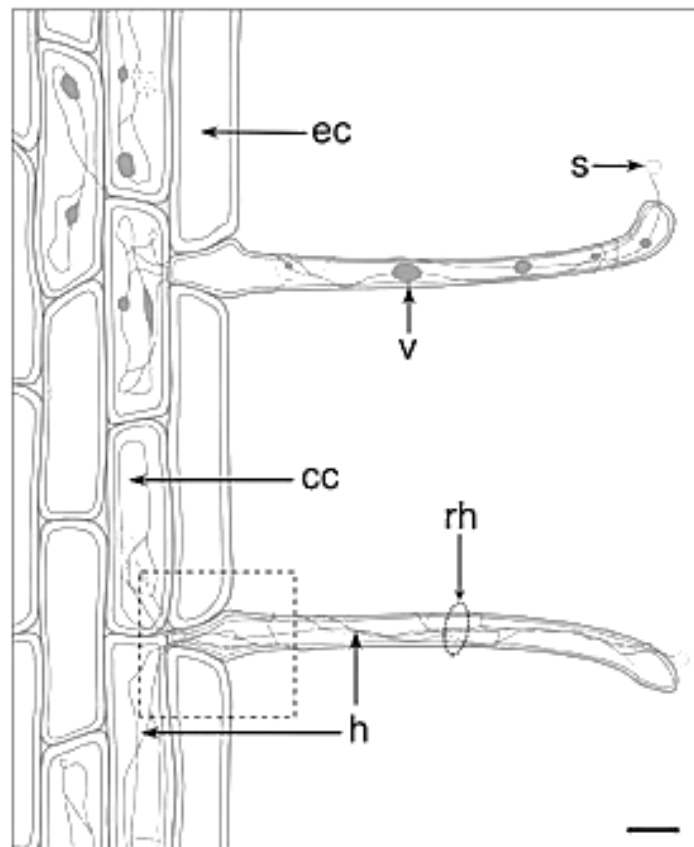


Figure 7 : Hyphes des endophytes de racines fines (ERF) avec vésicules et éventail, structures des sporophytes *Lycopodiella inundata* matures (ec : cellule épidermique, s : spore, cc : cellule corticale, rh : poile absorbante : h : hyphe, v : vésicule (Kowal et al., 2020)

1.9. Endophytes Sebaciales

Les champignons endophytes sebaciales (CES) appartiennent aux *Sebacinales* (*Hymenomyces*, *Basidiomycota*). Ces champignons colonisent un large éventail de bryophytes, ptéridophytes, angiospermes (monocotylédones et dicotylédones) et gymnospermes, y compris la plante non mycorhizienne *Arabidopsis thaliana*, sans provoquer de symptômes de la maladie (Varma et al., 2001; Weiss et al., 2011; Lahrman et al., 2013). Un réseau d'hyphes lâche se forme autour des racines et les hyphes se développent de manière inter- et intracellulaire dans l'épiderme ainsi que la couche externe du cortex chez certaines espèces végétales, mais ne colonisent pas les extrémités des racines et les zones méristématiques (Deshmukh et al., 2006; Fesel et Zuccaro, 2016).

Aucune structure d'interface morphologiquement distincte n'a été détectée à l'interface symbiotique (figure 8).

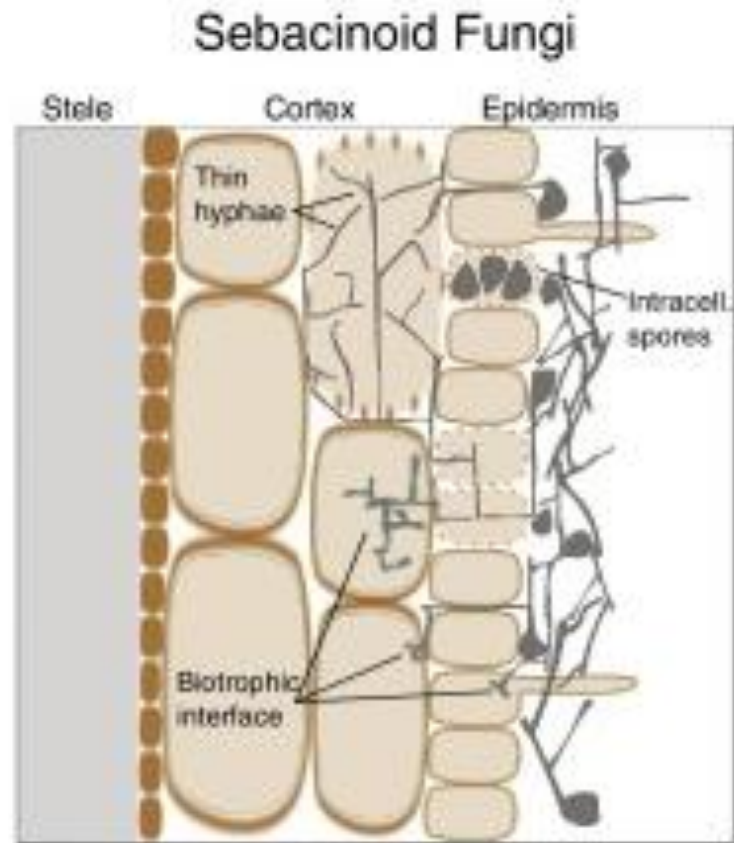


Figure 8 : Représentation schématique de la colonisation des endophytes Sebacinoides (Fesel et Zuccaro, 2016).

Les plantes hôtes tirent divers avantages des partenaires CES, notamment une croissance et une résistance améliorées contre divers stress biotiques et abiotiques tels que la salinité (Waller et *al.*, 2005; Deshmukh et *al.*, 2006; Weiss et *al.*, 2011). Un échange bidirectionnel de nutriments / Carbone a été observé entre les CSE et leurs hôtes mais un moyen spécialisé de transfert de nutriments n'a pas été signalée (Yadav et *al.*, 2010; Zuccaro et *al.*, 2011; Zuccaro, Lahrmann et Langen, 2014). Dans les cellules, les hyphes sont enveloppés par la membrane plasmique de l'hôte et établir une interaction biotrophique. Ils provoquent également la mort cellulaire préprogrammée des cellules corticales, dans laquelle ils dégradent ensuite les composés organiques de manière saprotrophe via la sécrétion d'enzymes extracellulaires telles que les protéases et les métalloprotéases (Zuccaro et *al.*, 2011; Lahrmann et Zuccaro, 2012; Zuccaro et *al.*, 2014).

Sebacinales est un ordre fongique important pour les études évolutives des symbiotes racinaires, composé de lignées qui ont des interactions très diverses avec les plantes, y compris le saprotrophisme, l'endophytisme et les associations mycorhiziennes (Weiss et al., 2016).

1.10. Endophytes brunes septées

Les endophytes brunes septées (EBS) sont des agrégats polyphylétiques de champignons appartenant à *Ascomycota* conidiens ou stériles, et partagent des hyphes mélanisés et cloisonnés comme leurs traits morphologiques communs (Rodriguez et White, 2009). *Acephala applanata*, *A. macrosclerotiorum*, *Phialocephal afortinii*, *P. glacialis*, *Vibrissea truncorum* et *Meliniomyces variabilis* font partie des champignons ascomycètes formant des associations EBS (Grünig et al., 2011). Ils colonisent les racines d'une variété près de 600 espèces d'angiospermes et de gymnospermes sans causer de symptômes apparents de maladie (Jumpponen et Trappe, 1998). Les hyphes poussent dans les racines de manière inter et intracellulaire et, comme les CES, ne forment pas de structures d'interface spécialisées pour l'échange de nutriments (Porrás-Alfaro, et Bayman, 2011, figure 9).

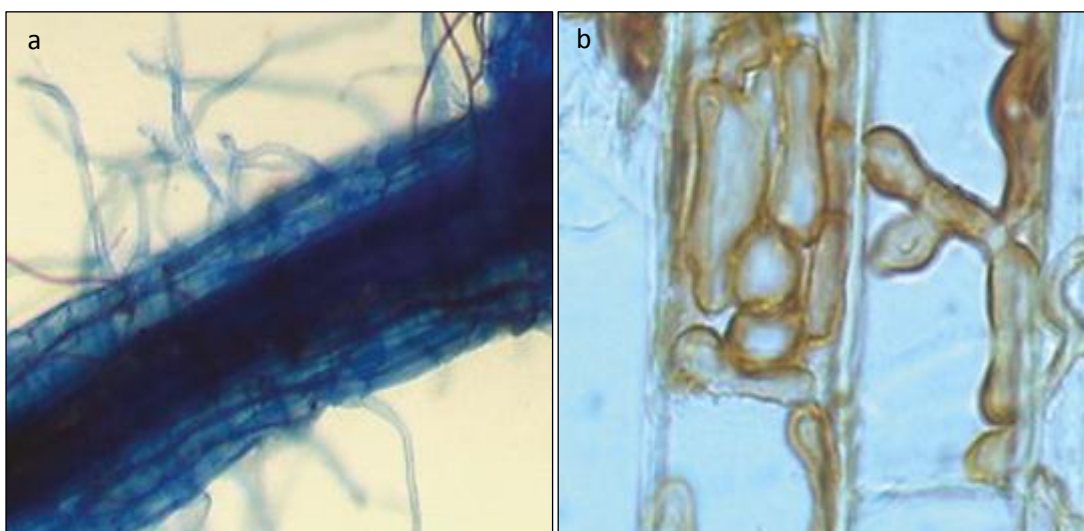


Figure 9 : Coupe racinaire colorée de *Bouteloua gracilis* montrant des hyphes internes et extraradicaux; (a) prolifération des hyphes dans les cellules végétales (b) (Porrás-Alfaro, et Bayman, 2011).

2. Intérêts des symbioses racines-champignons

Dans la symbiose mycorhizienne, la plante délivre des glucides produits par photosynthèse à son partenaire fongique, alors qu'en retour, la plante reçoit des éléments nutritifs du sol ainsi que de l'eau collectée par le champignon (Jansa et *al.*, 2020). En raison du mycélium étendu avec lequel le champignon colonise le sol, les plantes l'accès à une plus grande proportion du volume du sol, ce qui se traduit par une disponibilité accrue des éléments nutritifs du sol. Ainsi, on pense qu'une grande partie des nutriments minéraux de la plante proviennent de leurs partenaires fongiques. Cela peut expliquer pourquoi environ 90% de toutes les espèces végétales vivent en association avec partenaires fongique (Selosse et *al.*, 2006).

2.1. Amélioration de la nutrition minérale

Dans leurs interactions biotrophiques obligatoires, les CMA peuvent fournir à ses partenaires végétaux jusqu'à 80% d'azote et 100% du phosphore récupéré du sol, tous deux nécessaires à la croissance et au développement des plantes, en échange de jusqu'à 20% de le carbone fixé de façon photosynthétique produit par la plante (Hoysted et *al.*, 2018). Les lipides peuvent également être livrés au champignon, qui sont nécessaires à la production de lipides fongiques (Luginbuehl et *al.*, 2017). Plusieurs transporteurs sont impliqués dans ce commerce entre partenaires, qui émergent comme des déterminants clés du maintien de ces associations symbiotiques fonctionnelles. En ce qui concerne K⁺, il y a beaucoup moins d'informations sur la participation des microorganismes aux flux de ce cation lors de la symbiose (Haro et Benito, 2019).

Les effets des CMA sur la croissance des plantes a été étudiés chez plusieurs espèces (Diagne et *al.*, 2020). Selon Sella et *al.* (2017) ont révélé que l'inoculation par des CMA indigènes appartenant aux genres *Acaulospora*, *Glomus*, *Scutellospora*, *Entrophospora*, *Pascispora* améliore significativement la croissance des vitro plants d'arganier notamment lors de la transplantation.

Les champignons endophytes puissent également jouer un rôle important dans la nutrition des plantes (van der Heijden et *al.*, 2017). La capacité des endophytes à transférer des nutriments minéraux aux plantes est une découverte relativement récente,

et les mécanismes de ce transfert sont encore inconnus dans certains cas. Selon Usuki et Narisaw (2008) *Heteroconium chaetospora* est capable transférant l'azote de la matière organique en décomposition vers sa plante hôte. *Colletotrichum tofieldiae* et *Serendipita indica* ont démontré la capacité de transférer P à leur hôte non mycorhizien, *Arabidopsis thaliana*, favorisant sa croissance dans des conditions de faible P (Yadav et al., 2016 ; Hiruma et al., 2016).

Ces avantages pratiques de l'utilisation de champignons endophytes et des champignons mycorhiziens dans les applications biotechnologiques, comme biofertilisants.

2.2. Protection contre les pathogènes

Une résistance accrue des plantes mycorhiziennes contre les agents pathogènes du sol a souvent été observée (Whipps, 2004). Dans les racines, l'effet bio-protecteur exercé par les CMA semble reposer sur plusieurs facteurs biotiques tels que les génotypes fongiques / hôtes, le degré de mycorhization et l'altération du microbiote du sol, y compris le développement d'un antagonisme pathogène et l'accumulation de composés défensifs (Vierheilig et al., 2008; Cameron et al., 2013). Les effets sur les agents pathogènes aériens semblent dépendre grandement du mode de vie des agents pathogènes (Campos-Soriano et al., 2012; Jung et al. , 2012; Song et al., 2015; Sanchez-Bel et al., 2016).

Le renforcement des défenses basales dans les plantes mycorhiziennes a été défini comme la résistance induite par les mycorhizes (RMI) et plusieurs études ont souligné l'amorçage (comme mécanisme principal opérant dans le RMI) (Martinez-Medina et al., 2016). Cameron et al. (2013) ont proposé que le RMI soit un effet cumulatif des réponses des plantes à la colonisation mycorhizienne, capable de conférer une protection contre un large éventail de challengers, y compris les pathogènes biotrophes et nécrotrophes, les nématodes et les insectes. Les principaux acteurs proposés pour être impliqués dans ce processus sont les hormones végétales, c'est-à-dire l'acide salicylique, l'acide jasmonique et ses dérivés, l'éthylène et probablement l'acide abscisique, dont le taux évolue au cours des différentes étapes de mycorhization (Foo et al., 2013; Pozo et al., 2015).

De nombreuses études ont récemment révélé que les champignons endophytes ont la capacité de protéger l'hôte contre les maladies et de limiter les dommages causés par les microorganismes pathogènes (Pavithra et *al.*, 2020).

Plusieurs mécanismes peuvent être utilisés par les champignons endophytes pour inhiber les microorganismes phytopathogènes tel que la production d'antibiotiques, la stimulation des mécanismes de défense de l'hôte, la concurrence pour les nutriments ou les sites de colonisation, et le mycoparasitisme (Cao et *al.*, 2009). De nombreuses espèces de champignons endophytes produisent plusieurs métabolites secondaires dont des substances antibiotiques et antifongiques (Strobel, 2002; Wang et *al.*, 2007 ; Kim et *al.*, 2007).

2.3. Résistance aux stress abiotiques

Plusieurs études récentes confirment des effets positifs des CMA sur la croissance et la production des cultures sous des stress abiotiques tel que la haute température, le froid, la sécheresse, la salinité et les carences en nutriments et le stress des métaux lourds (AbdelLatef et *al.*, 2016). Divers mécanismes de tolérance induite par les CMA contre les adversités environnementales sont proposés (Rivera-Becerril et *al.*, 2005; Smith et Read, 2008b), consistant en :

L'amélioration de l'état hydrique et nutritionnel de la plante hôte;

Des altérations significatives des sucres, des polyamines, de la proline, des lipides, des hormones de stress et de l'expression des gènes de signalisation et liés au stress;

Des changements dans la physiologie végétale, tel que l'ajustement osmotique, échange gazeux, photosynthèse, perméabilité relative et fuite d'électrolyte;

Des systèmes antioxydants améliorés pour atténuer efficacement le stress oxydatif;

Chélation des racines et des champignons et inactivation ou élimination des substances polluantes (López-Ráez, 2016).

Cependant, dans les sols exposés au stress abiotique, la diversité des CMA est généralement plus faible que dans les sols non perturbés. Ces espèces présentent un comportement opportuniste, car elles investissent leur énergie principalement dans la

production de nombreux descendants, et ont des caractéristiques évoluées qui sont avantageuses dans des environnements défavorables (Sykorová et *al.*, 2007)

Les champignons endophytes sont une nouvelle source de métabolites secondaires bioactifs; de plus, ils produisaient également des gibbérellines physiologiquement actives. La symbiose des champignons endophytes avec les cultures peut être une stratégie prometteuse pour surmonter les effets néfastes des stress abiotiques. L'association de tels endophytes a non seulement augmenté la biomasse végétale, mais également amélioré la croissance des plantes dans des conditions environnementales extrêmes (Khan et *al.*, 2015). Les mécanismes moléculaires pour augmenter la tolérance au stress chez les plantes par les endophytes comprennent l'induction de gènes de stress des plantes ainsi que des biomolécules comme des piègeurs réactifs d'espèces d'oxygène (Lata et *al.*, 2018).

Partie I: Revue bibliographique

Chapitre 2.

Généralités sur l'arganier

Chapitre 2 : Généralités sur l'Arganier

1. Aperçu historique

L'arganier est une espèce qui date de l'ère tertiaire (l'époque où les côtes marocaines étaient liées aux îles Canaries). Il se serait répandu sur une grande partie du Maroc puis, au quaternaire, l'arganier aurait été refoulé au sud-ouest par l'invasion glaciaire, ce qui expliquerait l'existence actuelle de quelques colonies vers la région de Khémisset (du Rabat), et au nord près de la côte méditerranéenne, dans les Beni Snassen (Radi, 2003).

La connaissance et l'utilisation de l'arganier par l'homme est très ancienne. Au X^{ème} siècle, ce sont les phéniciens qui auraient utilisé l'huile d'argan dans leurs comptoirs installés le long de la côte atlantique (M'hirit, 1989). La première mention de l'arganier remonte au X^{ème} siècle, où Ali Ibn Rodhwan avait décrit l'usage des fruits de cet arbre sans faire sa description (Boukhaboza et Pichon-Prum, 1988).

La première description de l'arbre sous le nom de "arjân" a été faite au XIII^{ème} siècle par le savant égyptien Ibn Al-Baytar dans son livre "Traité des simples". Il avait consacré trois monographies à cet arbre et à ses différentes parties. Il rapporte que l'arbre est nommé "arjân", son fruit "lûz al-birbir" et son huile "zayt as-soudan" (Khallouki, 2003).

En 1515, El Hassane Ben Mohamed El Wazzani El Zagayati (dit Jean Leon L'africain), dans son livre intitulé "Description de l'Afrique" décrit l'arganier comme étant "un arbre épineux produisant des fruits dont on extrait une huile qui sert à l'alimentation et l'éclairage" (Baumer et Zeraia, 1999).

En 1737, Carl Von Linne classe l'arganier, dans son "Hortus chifortianus", dans le genre Rhammus sous le nom de *Sideoxylon spinosun* L.

En 1819, Roem et Shoult créent le genre Argania, qui appartient à famille des sapotacées. Ce monotype ne comprend qu'une seule espèce, *Argania spinosa* (Elabed, 2007).

En 1888, Cotton isole un principe actif à partir du tourteau du fruit de l'arganier et l'identifie comme étant un mélange de saponines en lui attribuant le nom arganine (Radi, 2003).

En 1929, Battino s'intéresse à l'huile d'argan et à d'autres produits de l'arganier, notamment l'arganine isolée par Cotton et à laquelle il prête une attention hémolytique in vivo et in vitro (Elabed, 2007).

En 1938, Emberger publiè "Les chèvres et l'arganier". Tandis qu'en 1965, Monnier, ingénieur des eaux et des forêts a dénoncé certaines pratiques comme la surexploitation et le défrichement qui menacent l'existence de l'arganier (Nouaim et *al.*, 1991).

Vu l'importance écologique, économique et sociale que présente l'arganier, certains pays se sont mis à des essais d'introduction de cet arbre dans l'espoir de développer sa culture et l'exploiter en tant qu'espèce à grande valeur ajoutée. Parmi ces pays on peut citer : La Hollande (1697), L'Angleterre (1711), La France (1852), Les Etats Unis (1927), et récemment La Tunisie, La Libye et Israël où il semble avoir donné de bons résultats d'adaptation (Elabed, 2007).

En Algérie, le développement de l'Arganier dans la région de Tindouf, par des reboisements et de la création d'une pépinière pour la production de plants d'Arganier, font partie des mesures retenues au titre d'une ambitieuse opération de valorisation et de préservation de cet arbre saharien (Lotfi et *al.*, 2015).

2. Classification et description botanique

Le genre *Argania Roem et Schult* est monotype. Avant la publication de la nouvelle classification des angiospermes (APG III et APG IV). La famille des Sapotacées qui compte une cinquantaine de genres et plus de 600 espèces a été classé dans l'ordre des Ebénales (M'Hirit et *al.*, 1998) . Cependant, la nouvelle classification phylogénétique a classé la famille des sapotacées dans l'ordre des Ericales comme suite (APG IV) :

Régne	Végétale
Embranchement	Phanérogames
Sous-embranchement	Angiospermes
Classe	Dicotylédones
Sous-classe	Gamopétales
Ordre	Ericales
Famille	Sapotacées
Genre	Argania
Espèce	<i>Argania spinosa</i> L. Skeels

L'Arganier est un arbre épineux. C'est un arbre relique de 1ère tertiaire et il est le seul représentant de la famille des sapotacées à se développer en dehors de la zone intertropicale. Parfaitement adapté à l'aridité du sud-ouest marocain, il supporte des températures allant de 3° à 50° C.

L'Arganier présente sous forme de buissons ou dressé (7 à 10 m). Sa croissance est lente mais l'Arganier est un arbre très résistant qui peut vivre de 150 à 200 ans.

Sa silhouette est caractéristique : cime large et ronde, tronc noueux, tortueux et assez court, souvent formé de plusieurs parties entrelacées (Figure 10).



Figure 10 : Arbre adulte de l'arganier de la région de Stidia (W. Mostaganem).

Le bois de l'Arganier est très dur. Il est utilisé essentiellement comme bois de chauffage, ce bois ne possède pas de cernes annuels nettement caractérisés (Emberger L. 1960). L'Arganier possède des mécanismes qui limitent ou ralentissent la chute du potentiel foliaire et relèvent de la stratégie d'évitement.

Les racines de l'Arganier plongent très profondément dans le sol. Elles permettent ainsi la récupération des eaux à partir de couches profondes. Ceci permet à l'Arganier de s'adapter à un climat semi-aride et aride (Emberger , 1960).

Les rameaux de l'Arganier sont très épineux, et garnis de petites feuilles ; les épines qui assurent une certaine défense de l'arbre, sont l'équivalent d'un rameau.

Les feuilles de l'Arganier sont petites, pratiquement persistantes, coriaces, vert sombre sur la face inférieure. Les feuilles sont alternes, souvent réunies en fascicules, lancéolées ou spatulées insensiblement atténuées en un pétiole plus ou moins distinct, avec une nervure médiane très nette et les nervures latérales très fines et ramifiées. Les feuilles sont subpersistantes, l'arbre ne les perd ainsi que transitoirement, en cas de grande sécheresse.

Les fleurs de l'Arganier sont blanches à jaune verdâtre, hermaphrodites, gamopétales à tube très court et sont réunies en glomérules.

Le fruit d'Arganier est formé d'un péricarpe charnu ou pulpe qui recouvre un noyau très dur (noix d'argane) représentant environ un quart du poids du fruit frais. La noix renferme une à trois amandons albuminées et huileuses (figure 11).

Le noyau se trouve sous différentes formes : fusiforme, ovale apiculée, ovale, goutte, arrondie et globuleuse (Ferradous et *al.*, 1996 ; Bani Ameur et *al.*, 1998). Les noyaux peuvent contenir d'une à trois amandes, dont l'albumen charnu et oléagineux. Le fruit entier est composé de pulpe (43 à 50 %), de coque (50 à 55 %) et d'amande (4,4 à 7,1%) (Bani Ameur, 2000).



Figure 11 : Aspect des fruits à l'état frais (a) et sec (b), des noyaux (c) et des amandes (d) d'arganier (*Argania spinosa* (L.) Skeels).

La croissance moyenne en épaisseur (largeur) de l'arbre est de 1,35 à 1,80 cm / an. Le système racinaire, particulièrement profond, est dépourvu des poils absorbants (racines magniloïdes). Pour son alimentation en eau et en sels minéraux, l'arbre profite d'une relation symbiotique qui le lie avec différents types de mycorhizes arbuscules appartenant surtout à l'ordre des Glomales (Benkheira, 2009 ; Aibeche et Fortas, 2011).

3. Le génome d'arganier

Le caryotype d'*A. Spinosa* (L.) est constitué de dix paires de chromosomes ($2n=2x=20$)³. Selon Khayi et *al.* (2018) Le génome d'arganier est de taille de 671 Mb.

D'autre part, le génome chloroplastique d'*A. Spinosa* est constitué d'une molécule circulaire mesurant 158848 pb de longueur, avec une teneur en GC de 36,9%, ce qui est cohérent avec d'autres génomes chloroplastiques séquencés de la famille des Sapotacées, dont la teneur en GC du plastome était de 36,8% et 38,9% pour *Pouteria campechiana* et *Sideroxylon wightianum*, respectivement. Le génome chloroplastique

d'arganier a une région de répétition inversée de 25 945 pb de longueur, une grande région à copie unique de 88 367 pb et une petite région à copie unique de 18 591 pb (Khayi et *al.*, 2020).

Le processus d'annotation a prédit un total de 130 gènes fonctionnels représentant 85 gènes codant pour les protéines, 37 ARNt et 8 ARNr. Les séquences de domaine codant représentent 80 967 pb de longueur, ce qui représente 50,97% du génome chloroplastique d'*A. Spinosa*. La proportion de gènes pour l'ARNt est de 1,75% et celle pour l'ARNr est de 5,69%. La proportion de régions non codantes, qui contiennent des espaceurs intergéniques et des introns, représente 49,02% du génome chloroplastique (Khayi et *al.*, 2020).

4. Répartition géographique

Des études éco-physiologiques ont montré que l'arganier s'adapte bien aux conditions d'aridité du milieu du fait des mécanismes régulateurs des variations simultanées du potentiel hydrique foliaire et de la transpiration dont il est pourvu. En effet, l'arbre possède des mécanismes physiologiques qui lui permettent de moduler la chute des feuilles. Ainsi l'arbre peut résister à des stress hydriques intenses grâce à sa capacité de défoliation (Bezzala, 2005 ; Msanda et *al.*, 2005).

Au Maroc, L'arganier est une espèce endémique du Sud-Ouest Marocain. Il constitue la deuxième essence forestière du pays, après le chêne vert (Stussi et *al.*, 2005). Son aire géographique principale s'étend entre les embouchures de l'Oued Tensif (au Nord) jusqu'à celles de l'Oued Soussen (au Sud), soit entre 29° et 32° de latitude Nord. Ainsi, elle s'étale dans une grande partie de la plaine du Sousse, sur le versant sud du Haut Atlas et sur le versant Nord de l'Anti-Atlas (figure 12). La limite sud de la forêt d'arganier se situe aux environs de l'Oued Noune (Nouaim et Chaussod, 1994). D'après Radi (2003), il existe aussi dans la région Nord-Est Marocaine, du côté d'Oujda et dans les routes de Béni-Senassen quelques colonies d'arganier. La forêt d'arganier occupe une superficie d'environ 828 000 ha (l'équivalent de 7 % de la superficie forestière de Marocaine), et compte plus de 20 millions d'arbres. On note cependant que ces

superficies sont en perpétuelle régression à cause surtout de l'intervention de l'homme (surexploitation). A titre indicatif cette régression est présentement de l'ordre de 600 ha/an (Tarrier et Benziane, 2003).

En Algérie l'*Argania spinosa* est localisée essentiellement sur les lits de certains Oueds, notamment : Oued El-ma, Oued Elghahouane, Oued Bouyadhine, Oued El-khebi, Oued Merkala et Oued Targant. Ainsi, elle est pourvue d'un entrelace épars de ruisseaux, coulant vers les petites dépressions entre les gorges Hamadienne du Drâa et les falaises de K'reb El-hamada, et la dépression du Nord de Tindouf (Figure 11) (Lotfi et *al.*, 2015).

La distribution des populations d'Arganier a été déterminée sur la carte en trois unités hydro géographiques représentés principalement par les périmètres suivants : Touaref Bou-âam, Merkala et Targant. Dans son milieu naturel, *Argania spinosa* couvre une superficie de 90 644 ha où on peut la trouver surtout dans les lits d'oueds sablonneux, graveleux et rocheux (Khallouki et *al.*, 2005 ; Msanda et *al.*, 2005). Son aire de distribution semble donc très restreinte. Il existe aussi quelques essais d'introduction réussis de cet arbre dans de nombreux endroits du pays comme la région de Stidia (Wilaya de Mostaganem), de Chlef, de Sig (Mascara) et de l'INA d'El Harrach (Mebarki et *al.*, 2006).

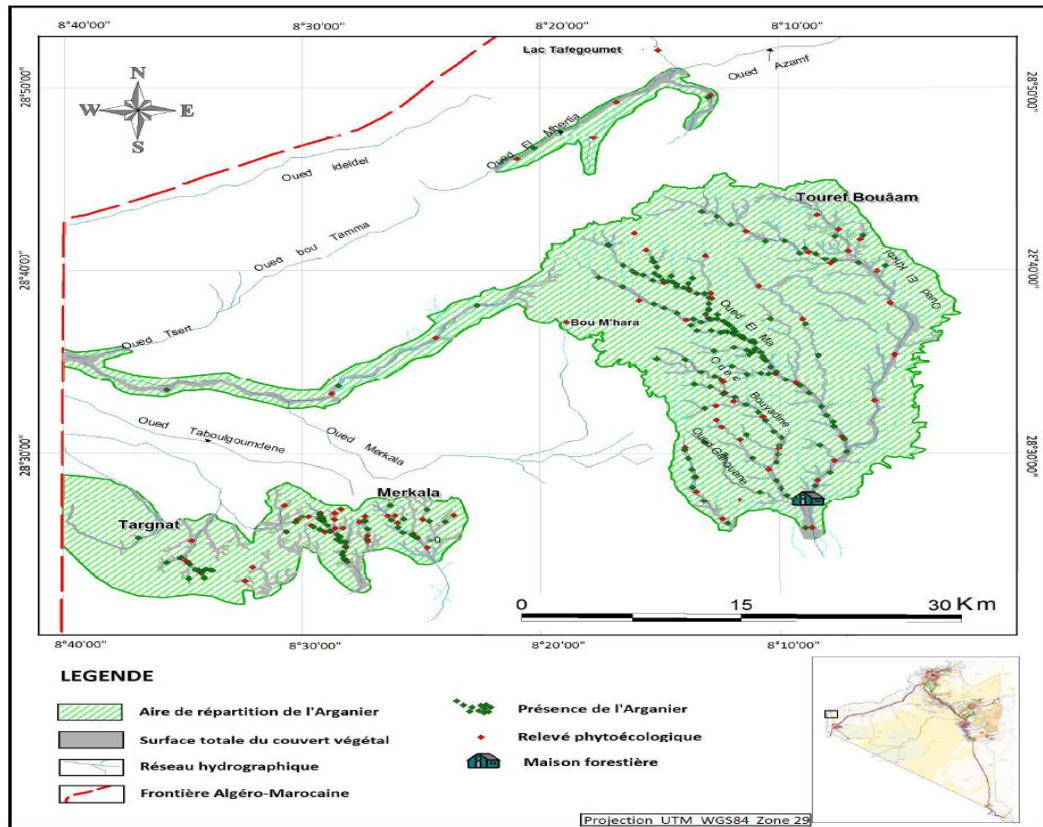


Figure 12 : Aire de répartition de l'Arganier en Algérie (CRSTRA, 2015).

5. Exigences écologique et édaphiques de l'Arganier

L'Arganier procure un équilibre écologique essentiel à son écosystème. Des études biologiques, physiologiques et génétiques, réalisées sur l'Arganier ont montré que cette espèce peut résister à des conditions écologiques d'une extrême sévérité. Il peuple des bioclimats sahariens, arides et semi-arides (sud marocain et sud-ouest algérien) (Alifriqui, 2004).

Cette plante est une essence qui semble être indifférente à la structure physico-chimique des substrats du sol. C'est un arbre qui peut résister à tous les types de sols : salés, superficiels, squelettiques, profonds, pauvres, siliceux ou calcaires (Alifriqui, 2004).

L'étude du potentiel hydrique foliaire à différentes profondeurs a montré que les racines de l'Arganier possèdent la capacité de puiser l'eau et de la préserver dans son réservoir interne d'où sa résistance à la sécheresse (Nouaim, 2005).

L'Arganier procure un équilibre écologique essentiel à son écosystème. Des études biologiques, physiologiques et génétiques, réalisées sur l'Arganier ont montré que cette espèce peut résister à des conditions écologiques d'une extrême sévérité. Il peuple des bioclimats sahariens, arides et semi-arides (sud marocain et sud-ouest algérien) (Alifriqui, 2004).

L'Arganier est une essence qui semble être indifférente à la structure physico-chimique des substrats du sol. C'est un arbre qui peut résister à tous les types de sols : salés, superficiels, squelettiques, profonds, pauvres, siliceux ou calcaires (Alifriqui, 2004).

6. Intérêts et usages de l'Arganier

L'Arganier, arbre sublime, comme aiment le qualifier les autochtones, peut jouer plusieurs rôles à la fois : écologique, économique et social. C'est une essence à multi usages, puisque chaque partie de l'arbre est utilisée et valorisée.

6.1. Intérêts écologiques

L'Arganier joue un rôle irremplaçable dans l'équilibre écologique et dans la préservation de la biodiversité grâce à son système racinaire puissant pouvant se prolonger jusqu'à 30 m de profondeur pour aller chercher l'eau nécessaire à sa survie (Radi, 2003).

Grâce à son puissant système racinaire, l'arbre contribue au maintien du sol et permet de lutter contre l'érosion hydrique et éolienne qui menacent de désertification une bonne partie de la région (Ottmani, 1995 ; Tarfes, 1997 ; Charrouf, 2000 ; Calonne, 2007).

De plus, grâce à son effet ombrage et améliorateur du sol, il permet une production agricole non négligeable dans les conditions climatiques actuelles. Le sol est toujours plus humide sous l'arbre et les activités microbiennes y sont plus importantes, en particulier, pour ce qui concerne la minéralisation d'azote et la disponibilité du phosphore (Nouaim, 1995 ; Radi, 2003).

Enfin, de nombreux organismes vivants (faune, flore et microflore) sont directement liés à sa présence (Benchekroun, 1995).

La disparition de l'Arganier entraînerait certainement la disparition de plusieurs espèces, provoquant une diminution de la biodiversité dans la région, c'est-à-dire, une réduction du patrimoine génétique, aussi bien pour l'arbre que les autres espèces animales, végétales ou microbiennes (Taieb-Brahimi, 2005).

6.2. Intérêts socio-économiques

L'Arganier joue un rôle socioéconomique très important. Dans ce cas, l'exemple des arganeraie marocaine est édifiant. Dans ce pays, l'arganeraie s'est toujours prête à une exploitation traditionnelle que les populations usagers continuent à pratiquer. Dans certaines zones du royaume, elle constitue l'unique recours pour la survie de ces populations (Charrouf, 1998). Elle permet de stabiliser les populations des campagnes et donc de limiter l'exode rurale (Benzyane, 1995 ; Tarfes, 1997). Plusieurs emplois (coopératives féminines) ont été créés dans différentes provinces du royaume afin de valoriser localement les produits de l'Arganier. Ces initiatives sont faites dans le cadre d'un « programme d'appui à l'amélioration de la situation de l'emploi de la femme rurale et gestion durable de l'arganeraie » (Ziane, 2006).

Selon Guyon (2008), le secteur de l'arganier a permis d'atteindre les objectifs suivants :

- la procuration de 7 millions de journées de travail familial par an ;

- la production de 80 000 tonnes de coques utilisées comme combustible ;

- la production de 5 400 tonnes de tourteau utilisé dans l'engraissement des bovins.

Le bois de l'arganier est un bois dur et résistant. De ce fait, il est appelé bois de fer. Il constitue un très bon bois combustible dont le rendement dépasse un quintal de charbon pour une stèle de bois. Il est aussi utilisé pour les besoins de la petite industrie familiale (porte, perches, perchettes,...), et pour la fabrication d'objets ménagers et d'instruments agricoles (araires, charrues,...). Son étude phytochimique a révélé sa richesse en nombreux saponines triterpéniques (Charrouf, 2002).

La pulpe du fruit de l'arganier est utilisée comme aliment pour les caprins. Elle est riche en glucides et en protéines. L'extrait de la pulpe est constitué de glycérides, d'un latex (caoutchouc) et d'une fraction insaponifiable. La composition chimique de cette dernière fraction est riche en stérols en alcools triterpéniques tels : L'erythordioliol, le lupéol, l' α et la β -amyrine. Ces alcools pourraient subir des transformations par voie chimique ou par bioconversion pour conduire à d'autres produits à forte valeur ajoutée (Zarrouck et *al.*, 1987).

Les feuilles servent de pâturage suspendu pour le bétail (caprins et camelins). Elles sont aussi utilisées en médecine traditionnelle pour leurs propriétés anti-inflammatoires. Elles sont très riches en composés triterpéniques similaires à ceux décrites chez la pulpe. Les études portées sur la fraction flavonoïde ont montré la présence de la quercitrine, la myricétine et leurs hétérosides. En plus de leur activité antioxydante, ces deux flavonols présentent des propriétés antifongiques et antibactériennes remarquables (Charrouf, 2002).

L'huile d'argan est considérée actuellement comme l'huile alimentaire la plus chère au monde. Son prix est encore exorbitant lorsqu'elle est vendue sous forme de produit cosmétique (Romagny et Guyon, 2010). Au Maroc, la production d'huile d'argan a été estimée à 4 000 tonnes /an en moyenne (Chaussod et *al.*, 2005). Au tarif actuel de l'huile, sur les marchés internationaux, cela représente au moins un chiffre d'affaire total de 680 millions d'euros à partager entre différents acteurs : producteurs intermédiaires, industriels et commerçants (Romagny et Guyon, 2010).

L'huile d'argan constitue un très bon complément lipidique très recherché. Elle assure 25 % de l'apport en corps gras dans la région sud du Maroc (Adlouni, 2010). Environ 16 g d'huile sont suffisants pour assurer la totalité des besoins journaliers en acide linoléique. Ses qualités organoleptiques et nutritionnelles en font de l'huile un produit très prisé par les consommateurs et qui se vend nettement plus chère que l'huile d'olive en raison notamment de sa rareté. (Rammal et *al.*, 2009). La forte teneur en acide linoléique de l'huile d'argan lui confère des propriétés revitalisantes sur la peau. Des recherches récentes ont mis en évidence l'importance biologique et pharmacologique du

γ tocophérol contenu dans l'huile. La présence de ce constituant confère à l'huile un effet protecteur contre le vieillissement (Charrouf et *al.*, 2007 ; Jiang et *al.*, 2000 ; Khallouki et *al.*, 2003).

Une autre enquête épidémiologique a permis de mettre en évidence un taux plasmatique élevé de vitamine E chez les sujets consommateurs d'huile d'argan (Drissi et *al.*, 2004). Cette vitamine joue un rôle antioxydant et aide généralement à réguler le niveau de cholestérol plasmatique. Des taux inférieurs en lipides plasmatiques et en lipoprotéine de petite densité (LDL) ont systématiquement été observés chez les populations consommatrices d'huile d'argan (Derouiche et *al.*, 2005).

L'une des principales caractéristiques de l'huile d'argan est la spécificité de son fraction insaponifiable riche en composés mineurs notamment les antioxydants (Uchida et *al.*, 1983). Bien qu'elles soient présentes en petite quantité, ces substances confèrent à l'huile d'argan des propriétés pouvant jouer un rôle remarquable dans la prévention du vieillissement tissulaire, de l'athérosclérose et aussi du cancer (Bennani et *al.*, 2007 ; Charrouf et *al.*, 2007 ; El Babili et *al.*, 2009).

7. Utilisations de l'huile d'argan

L'huile d'argan est un produit à usage multiple grâce à ses propriétés et vertus très intéressants.

7.1. Utilisation diététique

L'huile d'argan est une huile alimentaire connue depuis des millénaires par les populations de Sud-Ouest Marocain. Elle a été depuis longtemps exclusivement réservée à la cuisine traditionnelle berbère, mais depuis 2002, sa consommation a été officiellement agréée par l'état Marocaine (Rahmani, 2005).

L'huile d'argan constitue un très bon complément lipidique très recherché. Elle assure 25 % de l'apport en corps gras dans la région sud du Maroc (Adlouni, 2010). Environ 16 g d'huile sont suffisants pour assurer la totalité des besoins journaliers en acide linoléique. Ses qualités organoleptiques et nutritionnelles en font de l'huile un

produit très prisé par les consommateurs et qui se vend nettement plus chère que l'huile d'olive en raison notamment de sa rareté. C'est un élément essentiel à côté du miel et des amandes grillées pour certaines préparations alimentaires artisanales très consommées au Sud de Maroc (Rammal et *al.*, 2009).

7.2. Utilisation cosmétique

Depuis plusieurs siècles, les femmes marocaines connaissent les vertus de l'huile d'argan. Elle est utilisée traditionnellement pour nourrir le cuir chevelu, la fortification des angles cassants, le dessèchement cutané et le vieillissement physiologique de la peau. Cela a motivé certains laboratoires à l'incorporer dans la fabrication des produits cosmétiques (M'Hirit et *al.*, 1998). Mais les caractéristiques physicochimiques et organoleptiques de l'huile artisanale notamment son odeur et la difficulté de sa conservation empêchaient son utilisation en cosmétologie jusqu'à ce que le procédé industriel soit mis au point. Ainsi, depuis quelques années, l'huile d'argan est devenue fortement recherchée par l'industrie de cosmétique et figure dans la composition de certaines crèmes et savons (Adlouni, 2010).

7.3. Utilisation en médecine traditionnelle

En médecine traditionnelle, l'huile d'argan s'est forgée au fil des siècles la réputation d'un remède naturel précieux. Elle est utilisée par les autochtones grâce à ses propriétés multiples : aphrodisiaque, anti-vergeture, anti-acné, anti vieillissement physiologique et pour le traitement de différents maladies (Rammal et *al.*, 2009 ; Adlouni, 2010).

8. Intérêts thérapeutiques de l'huile d'argan

8.1. Dermocosmétique

La forte teneur en acide linoléique de l'huile d'argan lui confère des propriétés revitalisantes sur la peau. En effet, l'acide linoléique intervient aussi bien dans l'activité mitotique que dans le maintien de l'intégrité des membranes des kératinocytes épidermiques et de la kératinisation. L'apport équilibré en AG essentiel permet de

retarder la sénescence cutanée. Des recherches récentes ont mis en évidence l'importance biologique et pharmacologique du γ tocophérol contenu dans l'huile. La présence de ce constituant confère à l'huile un effet protecteur contre le vieillissement de la peau (Charrouf et *al.*, 1997 ; Jiang et *al.*, 2000 ; Khallouki et *al.*, 2003).

D'autres essais ont montré que le squalène pris comme supplément en diététique a des effets préventifs contre la carcinogenèse (Newmark, 1999). La majorité des phytostérols contenus dans l'huile d'argan sont le schotténol et le spinastérol, ce qui rend raisonnable de proposer que l'activité observée traditionnellement pour l'huile d'argan, dans le traitement ou la prévention des problèmes cutanés et pileux ainsi que ses indications cosmétologiques soient due à ces stérols (JEON et *al.*, 2005). Ces composés seraient responsables de l'activité cicatrisante et bienfaitrice de l'huile d'argan sur la muqueuse cutanée. Les effets hydratant, régénérant et structurant de cette huile ont été prouvés par des tests cliniques. L'application cutanée de l'huile d'argan restaure la couche hydrolipidique et augmente la teneur en nutriments des cellules cutanées. Elle stimule aussi l'oxygénation intracellulaire, neutralise les radicaux libres et protège le tissu conjonctif (Duke, 1992).

8.2. Prévention des maladies cardiovasculaires

Des enquêtes épidémiologiques au Maroc, comparant une population consommant régulièrement l'huile d'argan avec une autre ne la consommant pas, ont mis en évidence un risque inférieur à 50 % de développer une hypertension artérielle chez la population consommatrice d'huile (Berrougui et *al.*, 2006). De plus, la valeur moyenne des chiffres tensionnels des hypertendus, consommant régulièrement l'huile d'argan, trouvée inférieure à celle observée chez les sujets hypertendus n'ayant jamais consommé l'huile d'argan.

Une autre enquête épidémiologique a permis de mettre en évidence un taux plasmatique élevé de vitamine E chez les sujets consommateurs d'huile d'argan (Drissi et *al.*, 2004). Cette vitamine joue un rôle antioxydant et aide généralement à réguler le niveau de cholestérol plasmatique. Des taux inférieurs en lipides plasmatiques et en

lipoprotéine de petite densité (LDL) ont systématiquement été observés chez les populations consommatrices d'huile d'argan (Derouiche et *al.*, 2005).

Dans son étude menée sur l'effet de l'huile sur la contracture ischémique chez le rat recevant un régime enrichi en fructose (33 %) et en huile d'argan (5 ml/kg/jour), Benadjiba et *al.* (2002) ont montré une action bénéfique de l'huile sur la glycémie ainsi qu'une nette amélioration de la vulnérabilité cardiaque à l'ischémie. L'huile d'argan administré à une dose de 5 ml/kg/jour chez des rats spontanément hypertendus pendant dix jours, a permis la normalisation de leurs pressions artérielles et une diminution de leurs taux de cholestérol sanguin (Berrougui et *al.*, 2003).

Charrouf et *al.* (1997) ont montré que la consommation de deux cuillerées à soupe par jour d'huile d'argan induit une baisse du taux de cholestérol de 7,9 % pour les femmes et de 13,1 % pour les hommes à la fin du traitement. Parallèlement à la baisse du taux de cholestérol total, une diminution du taux des triglycérides a été observée. De plus si l'huile d'argan et l'huile d'olive ont induit une augmentation des taux de lipoprotéines de haute densité (HDL) plasmatiques, seule la consommation de l'huile d'argan entraîne une diminution significative (17,5 %) du taux des triglycérides plasmatiques (Derouiche et *al.*, 2005).

Plus récemment, Ould Mohamedou et *al.* (2011)_a ont montré que la consommation d'huile d'argan améliore le statut lipidique chez les patients qui n'ont jamais traité la dyslipidémie et peut donc être recommandé dans la prévention nutritionnelle et la gestion de la dyslipidémie. Elle peut aussi avoir un effet antiathérogène par l'amélioration des lipides et la susceptibilité des LDL à l'oxydation chez les patients atteints du diabète de type 2 avec dyslipidémie (Ould Mohamedou et *al.*, 2011)_b.

8.3. Prévention des cancers

L'une des principales caractéristiques de l'huile d'argan est la spécificité de son fraction insaponifiable riche en composés mineurs notamment les antioxydants (Uchida et *al.*, 1983). Bien qu'elles soient présentes en petite quantité, ces substances confèrent à l'huile d'argan des propriétés pouvant jouer un rôle remarquable dans la prévention du

vieillesse tissulaire, de l'athérosclérose et aussi du cancer (Bennani et *al.*, 2007 ; Charrouf et *al.*, 2007 ; EL BABILI et *al.*, 2009).

Le schotténol et le spinastérol sont les stérols majoritaires de l'huile d'argan. On les rencontre qu'exceptionnellement dans d'autres huiles végétales et sont surtout spécifiques à l'huile d'argan dans des proportions significatives (Yaghmur et *al.*, 2001 ; Benzaria et *al.*, 2006). Ces deux constituants semblent avoir des effets thérapeutiques très importants. Selon Villasenor et Domingo, 2000, le spinastérol possède un rôle anti-tumoral. Tandis que le schotténol, il semble avoir un effet anti-cancérigène avec un potentiel cytotoxique prononcé (Saleem et *al.*, 2009).

L'effet antiprolifératif des composés phénoliques, des tocophérols et des stérols contenus dans l'huile d'argan a été évalué *in vitro* sur les cellules épithéliales prélevées sur un adénocarcinome prostatique (Bennani et *al.*, 2007). Cette étude a montré que les polyphénols contenus dans l'huile d'argan auraient, à une concentration de 40 mg / ml, un effet inhibiteur de 30 % sur la prolifération cellulaire. Sur ce même type cellulaire, les stérols de l'huile d'argan auraient une activité inhibitrice de 20 % à une concentration de 20 mg / ml. De plus, la composition chimique spécifique de l'huile d'argan fait que la combinaison des différents facteurs qui la composent pourrait permettre une action antiproliférative (Khallouki et *al.*, 2003). Ces résultats corroborent avec les conclusions d'autres études scientifiques qui confirment l'action anti-prolifératrice des antioxydants sur les cellules tumorales (Hafeeze et *al.*, 2008 ; Bennani et *al.*, 2009 ; Saleem et *al.*, 2009).

Partie II: Etude expérimentale

Chapitre 3.

Matériels et méthodes

Chapitre 3 : Matériels et méthodes

1. Zones d'étude

L'étude a été réalisée sur des arbres adultes (âgés plus de 10 ans) d'arganier (*Argania spinosa* L. Skeels) poussant dans trois régions différentes de l'Algérie: Touaref Bouaim (Tindouf), Stidia (Mostaganem) et Chlef (station expérimentale de la conservation des forêts) (Figure 13).

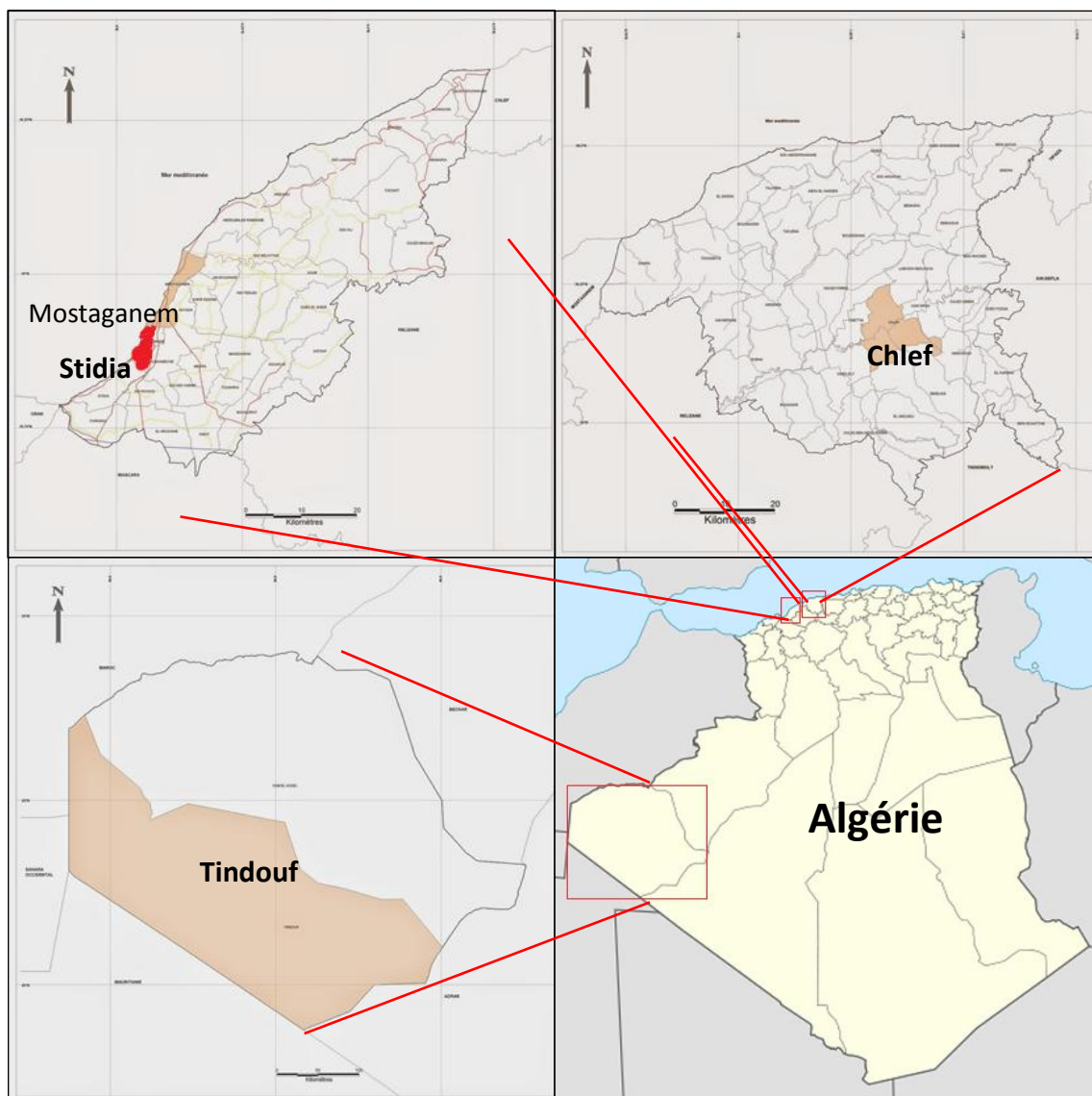


Figure 13 : Localisation géographique des zones d'étude

La zone de Tindouf est une région désertique située au sud-ouest de l'Algérie (28 ° 29'56 N 8 ° 07'09 O). La température annuelle moyenne est de 23,4 ° C et la moyenne annuelle des précipitations est de 30 mm. Quant aux zones de Mostaganem (35 ° 48'09. N 0° 03'59E) et de Chlef (36 ° 09'46 N 1 ° 20'12.22 E), elles sont situées au nord-ouest de l'Algérie. Le climat de Mostaganem est semi-aride (BSH selon la classification de Koppen-Geiger) avec une température annuelle moyenne de 18,3 ° C et une moyenne annuelle des précipitations moyennes de 436 mm. Le climat caractérisant Chlef est tempéré, chaud (CSa selon la classification de Koppen-Geiger). La température annuelle moyenne est de 18,6 ° C et les précipitations annuelles moyennes sont de 394 mm. Les plantes associées à l'arganier dans chaque région ont été identifiées par Pr. M'hammedi Bouzina Mahfoudh et Mr. Rouabhi Abdeldjebar (Université Hassiba Benbouali de Chlef) (Tableau 1).

Tableau 1: Quelques caractéristiques écologiques des trois sites d'étude

Région	Chlef	Mostaganem	Tindouf
Cordonnées	36°09'46.95"N 1°20'12.22"E	35°48'09.81"N 0°03'59.30"E	28°29'56.47"N 8°07'09.72"W
Température annuelle moyenne	18.6° C	18.3° C	23.4° C
Précipitations annuelles moyennes	394 mm	436 mm	30 mm
Altitude	119 m	35 m	537 m
Plantes associées	<i>Oxalis sp</i> <i>Olea europea</i>	<i>Souchus arvensis</i> <i>Malva sylvestris</i> <i>Avena sativa</i> <i>Echium vulgare</i> <i>Hordium vulgare</i> <i>Bromus sp</i> <i>Plantago lanceolata</i> <i>Antenis coatula</i> <i>Chrysanthemum sp</i> <i>Cenaurea napifolia</i>	<i>Acacia tortilis</i> , <i>Acacia radiana</i> <i>Anabasis articulata</i> , <i>Asphodelus sp.</i> <i>Aristida pungens</i> , <i>Calotropis procera</i> <i>Chrysocomoides cassini</i> <i>Euphorbia guyoniana</i> <i>Faidherbia albida</i> , <i>Genista saharae</i> <i>Helianthemum lippii</i> <i>Moricandia arvensis</i> , <i>Marrubium deserti</i> , <i>Nolletia sp.</i> <i>Retama monosperma</i> , <i>Rhus tripartitus</i> , <i>Zizyphus lotus</i> <i>Zilla spinosa</i>

2. Prélèvement des échantillons

De chaque région, cinq spécimens sains d'Arganier ont été sélectionnés au hasard pour effectuer les prélèvements de nos échantillons (sols et/ou racines) (Figure 14). Au tour de chaque arbre et à une profondeur allant de 0 à 30 cm de profondeur, 4 réplifications dans les directions cardinales ont été collectées et homogénéisées pour former un seul échantillon. L'humus et les feuilles sèches / non décomposées ont été éliminées, avant la collecte, des échantillons. De fines racines ont été stérilement excavées et tracées à partir de l'arbre d'origine pour garantir l'identité. Les échantillons ont été conservés dans des sacs en plastique et stockés à 4 ° C jusqu'au moment des traitements et analyses. Quant aux échantillons (racines et sols) destinés pour l'isolement et la caractérisation des champignons endophytes, ils sont récoltés et conservés dans des boîtes de polyéthylène stériles à 4 °C.

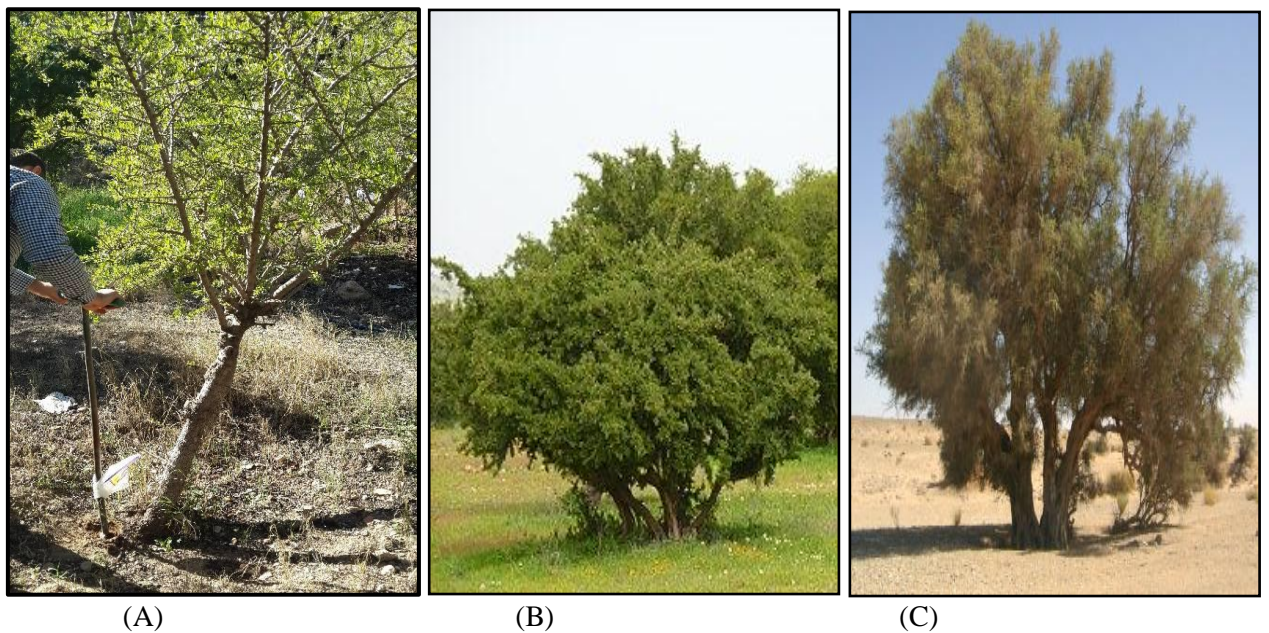


Figure 14: Arbres d'Argnaier A : Arganier de Chlef, B : Arganier de Mostagnem, C : Tindouf.

3. Analyses physico-chimiques des sols

Les analyses physico-chimiques des sols prélevés des zones d'étude, ont été réalisés au laboratoire d'analyses de sol de l'agence nationale des ressources hydriques (ANRH), afin d'évaluer la relation entre la diversité fongique et la composition du sol. Les paramètres évalués sont : la granulométrie, le pH, la conductivité électrique, la teneur en carbone et en matière organique, le phosphate assimilable, l'azote total, et le calcaire.

3.1. Analyse granulométrique

L'analyse granulométrique du sol consiste à classer les éléments du sol selon leur grosseur et à déterminer la proportion de chaque fraction (sable, limon et argile) afin de déterminer la texture et la surface spécifique d'un sol. Cela permet d'estimer sa capacité d'absorption des éléments minéraux et des substances organiques

La granulométrie est déterminée après séparation des particules grossières par tamisage du sol à travers un tamis (porosité = 2mm). La matière organique est éliminée par l'ajout de l'eau oxygénée (H_2O_2). Les particules minérales sont ensuite dispersées par l'hexa-méta-phosphate de sodium. Les particules moyennes et fines sont obtenues par la mesure de la vitesse de sédimentation (Rouiller *et al.*, 1994). La texture des sols est déterminée en se référant au diagramme des textures des sols (Figure 15).

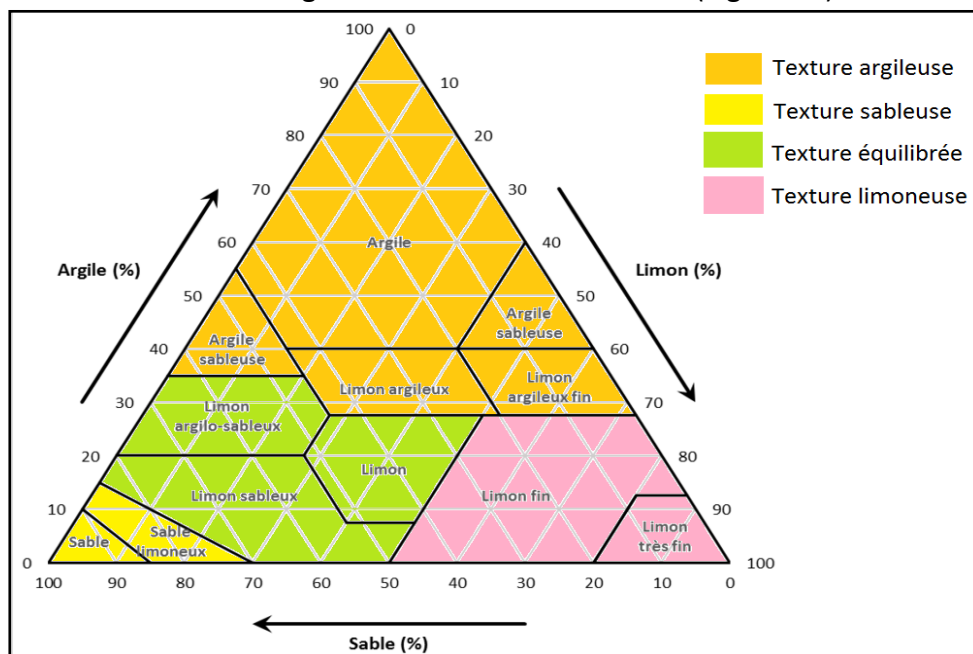


Figure 15 : Diagramme des textures des sols (USDA, 1951, in Richer *et al.*, 2008)

3.2. Mesure du pH

Le pH du sol exprime l'acidité actuelle du milieu, c'est-à-dire la concentration en ion H^+ dans la solution du sol au moment de la mesure.

La mesure du pH du sol s'effectue sur une suspension de sol (rapport sol/solution : 1 / 2,5) dans de l'eau distillée. Le contenu est agité pendant quelques minutes, puis laissé reposer pendant 2 heures. Le pH est ensuite mesuré par un pH-mètre après agitation (ISO, 2005).

3.3. Mesure de la conductivité électrique

La conductivité est la mesure de la capacité du sol à conduire un courant électrique. Elle est liée à la concentration et à la nature des sels minéraux dissous et se mesure par un conductimètre à une température de 25°C avec un rapport 1/5 (sol/solution) (Rayment et Higginson, 1992).

3.4. Dosage du carbone total et de la matière organique

La teneur en matière organique joue un rôle important dans la fertilité du sol. Elle augmente sa capacité d'échange cationique et retient les nutriments assimilables par les plantes. Ainsi, la matière organique constitue un réservoir de nutriments lentement assimilables (Baldock et Nelson, 2000).

Le carbone total du sol est dosé, selon la méthode de Anne (1945). Cette technique est basée sur l'oxydation du carbone organique d'un échantillon du sol avec le bichromate de potassium en excès dans un milieu acide. L'excès de bichromate non réduit par le carbone organique est par la suite titré par une solution de sel de Mohr. Ce titrage se fait en présence d'un indicateur coloré, la diphenylamine, qui vire au vert foncé lorsque l'excès de bichromate est réduit (Mathieu et pieltan, 2003).

Le dosage consiste à placer 1g du sol dans un ballon liée à un réfrigérant. A l'aide d'une pipette, 10 ml de bichromate de potassium à 8 %, et 15 ml de l'acide sulfurique concentré sont ajoutés. Le contenu est chauffé jusqu'à l'ébullition.

Après 5 minutes d'ébullition, puis refroidissement, le contenu est ensuite transféré dans une fiole jaugée, tout en effectuant plusieurs lavages puis on complète le volume jusqu'à 200 ml avec de l'eau distillée. Laisser reposer pendant une ½ heure.

A partir du surnageant, 20 ml est prélevé dans un erlenmeyer (pour le titrage avec le sel de Mohr) après avoir ajouté 3 à 4 gouttes de diphénylamine et 5 ml de fluorure de sodium (NaF) à 3 %. On effectue un témoin avec du sable stérile calciné, soit :

n : la quantité de sel de Mohr correspond au témoin,

n': la quantité de sel de Mohr correspondant à l'échantillon

$$C \% = (n - n') \times 0,615$$

$$MO \% = 1.724 C \% \text{ (Mathieu et pieltain 2003).}$$

3.5. Dosage de l'azote total

L'azote (N) joue un rôle majeur en agriculture, étant un élément essentiel à la croissance des plantes. La quantité de l'azote total est déterminée par la méthode de Kjeldahl.

La technique consiste dans une première étape à minéraliser l'échantillon en milieu acide fort et en présence de sélénium ou de cuivre. Cette étape permet de transformer la plupart des composés azotés présents en sulfate d'ammonium. La deuxième étape est la distillation du minéralisât en milieu alcalin dans une solution d'acide sulfurique dilué en excès qui libère l'ammoniac pour former une solution de sulfate d'ammonium. La teneur en azote ammoniacal de cette solution est analysée par titrage par l'acide Sulfurique et la quantité de l'azote est proportionnelle au volume de l'acide sulfurique (Pansu et Gautheyrou, 2003).

3.6. Dosage du phosphore assimilable

Le phosphore (P), bien qu'il ne soit pas très abondant dans les sols, il compte parmi les éléments majeurs et joue un rôle fondamental dans les cycles agronomiques et biogéochimiques. En effet, il est nécessaire à la nutrition des plantes. Il participe aux processus métaboliques tels que la photosynthèse, le transfert d'énergie et la synthèse et la dégradation des glucides.

Le dosage consiste tout d'abord à l'extraction du phosphore par agitation avec une solution d'hydrogénocarbonate de sodium à pH = 8,5. La solution alcaline d'hydrogénocarbonate peut abaisser la concentration des ions calcium par précipitation sous forme de carbonate de calcium et celle des ions aluminiques et ferriques par précipitation sous forme d'hydroxydes. La concentration des ions phosphate augmente en conséquence et le phosphore « assimilable » peut être extrait de l'échantillon du sol par la solution d'hydrogénocarbonate de sodium et par filtration. Cette solution d'extraction a tendance à dissoudre les matières organiques et donne parfois des extraits colorés. Ainsi avant de procéder à la formation du bleu de molybdène, La teneur en phosphore assimilable est ensuite déterminée par spectrophotométrie UV-Visible (Petard, 1993).

3.7. Dosage du calcaire total

La présence de calcaire confère au sol des caractéristiques spécifiques en termes de comportement physique et chimique et influe sur son activité biologique. Son absence totale cause une acidification progressive du sol.

La teneur en calcaire totale est déterminée par le calcimètre de BERNARD après la mise en contact du sol avec un acide fort qui dissout le calcaire, en milieu fermé. L'attaque du calcaire (CaCO_3) se traduit par un dégagement gazeux de CO_2 dont le volume est mesuré (ISO, 2014).

4. Mise en évidence de la symbiose

Cette partie est consacrée à la mise en évidence et à l'évaluation du taux de mycorhization racinaire de l'arganier dans les trois régions étudiées (Chlef, Mostaganem et Tindouf).

Pour une bonne observation des structures mycorhiziens, il est nécessaire d'éclaircir les racines en éliminant les contenus cellulaires puis de les colorer avec un colorant spécifique « le bleu trypan » en suivant la technique adoptée par Philips et Hayman (1970) selon les étapes décrites ci-dessous.

4.1. Eclaircissement

Les fragments racinaires ont été plongés dans le KOH à 10 % pendant 45 min à une température de 90 °C afin de vider le contenu cytoplasmique. Après lavage à l'eau distillée, les racines sont mises dans une solution de H₂O₂ (30 %) pendant 20 min.

Les racines sont ensuite trempées dans l'acide lactique à 10 % pendant 20 min pour permettre la neutralisation de l'hydroxyde de potassium restant. Les racines sont à nouveau rincées à l'eau distillée.

4.2. Coloration

La coloration par le **Bleu de trypan** a pour le but de mettre en évidence les différences entre les structures mycorhiziennes. Cette étape permet la coloration de la chitine des parois fongiques.

Les racines éclaircies sont immergées dans une solution de Bleu trypan acide à 0.03 %, diluée dans du lactoglycérol (1/3 d'eau, 1/3 de glycérol et 1/3 d'acide lactique), pendant 40 min à 90 °C. Les structures fongiques, telles que les arbuscules, les vésicules et le mycélium apparaissent en bleu.

Chaque système racinaire découpé en fragments d'environ 1 cm et monté entre la lame et la lamelle pour une observation et évaluation microscopique et ensuite la conservation.

4.3. Observation et quantification de la mycorhization

La procédure consiste à évaluer le taux de mycorhization des différentes racines de *Argania spinosa* L. Les paramètres de la mycorhization ont été évalués par l'estimation globale des 50 fragments racinaires de chaque région, selon le Protocole décrit par Trouvelot et *al.*, (1986). Des fragments de racines ont été observés à des grossissements de 100 x et 400 x.

La fréquence, les niveaux d'infection des arbuscules et vésicules des CMA à l'intérieur de chaque racine ont été mesurés.

4.4. Fréquence de mycorhization (F)

Elle correspond au pourcentage des fragments racinaires mycorhizés, et reflète l'importance des points de pénétration de la colonisation du système racinaire.

$$F = (n_0 / N) \times 100$$

F = fréquence de mycorhization.

N = nombre de fragments observés.

n_0 = nombre des fragments avec mycorhizés

4.5. Intensité mycorhizienne (M %)

Elle exprime l'intensité de la colonisation du cortex racinaire (proportion du cortex colonisé estimée par rapport au système racinaire entier et exprimée en %) et reflète l'importance de la colonisation du système racinaire.

$$M \% = (95 n_5 + 70 n_4 + 30 n_3 + 5 n_2 + n_1) / N$$

n = le nombre des fragments affectés avec de mycorhization de 0 à 5 dont:

(0) : Aucune ;

(1) : Trace ;

(2) : Moins de 10% ;

(3) : 11-50% ;

(4) : 51-90% ;

(5) : Plus de 91% (Figure 16).

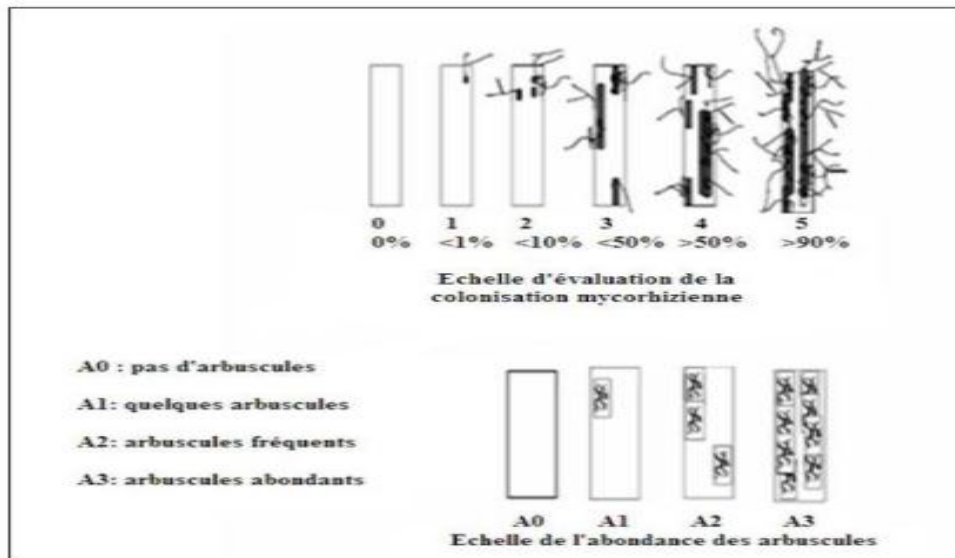


Figure 16 : Echelle d'intensité de colonisation du cortex racinaire

4.6. Teneur en arbuscules (A %)

La teneur en arbuscules "A" correspond à la proportion des fragments racinaires colonisés par les arbuscules.

5. Etude des champignons associés à *Argania spinosa*

5.1. Etude des champignons mycorhiziens à arbuscules (CMA) à partir du sol

5.1.1. Extraction des spores de CMA

L'extraction des spores de CMA a été réalisée, selon la technique adoptée par Gerdmann et Nicolson (1963). Elle est suivie d'une centrifugation sur un gradient de saccharose selon la méthode décrite par Giovanetti (1991). Les principales étapes de cette méthode se résument comme suit :

100 g du sol sont tamisés sous filet d'eau par des tamis de mailles décroissantes (500, 350, 250, 80 et 40 μm). Les tamisât contenant les spores des CMA sont mis en suspension dans de l'eau distillée stérile.

La suspension sporale est centrifugée une première fois à 2000 tr/min, pendant 5min, afin de réduire les particules du sol et les fragments racinaires. Le surnageant est

ensuite filtré sur un tamis de 40 µm. Le dernier tamisât est soumis à une centrifugation dans un gradient de saccharose (20/60 %) à 2000 tr/min pendant 5 min (Sturmer et *al.* 1998).

Par la suite, le surnagent est filtré à nouveau sur un tamis de 40 µm et le tamisât est lavé par l'eau distillée afin d'éliminer l'excès en saccharose. Les spores et les sporocarpes sont récupéré dans une boîte de Pétri puis examinés sur un stéréoscope, comptés et regroupés selon leur caractéristiques phénotypiques (couleur, taille, hyphe d'attachement).

5.1.2. Description et identification morpho-anatomique des spores

Pour la caractérisation et l'identification morphologique des champignons mycorrhiziens à arbuscules, les spores de chaque morphotype, sont récupérées à partir des sols collectés. Elles sont ensuite montées entre lame et lamelle. Une moitié des spores sont observées sous microscope optique après l'addition du **PVLG** (Polyvinyle-Acide Lactique-Glycérol), en revanche l'autre moitié, est observée après l'ajout d'un mélange contenant la solution de **PVLG** et le **Réactif de Melzer** (1 : 1 / v : v) (Koske et Tessier, 1983).

Les parois sporales et les diamètres des spores sont mesurées au microscope optique (relié à un ordinateur avec digital image analysis software) entre lame et lamelle préparé selon la méthode décrite par Azcon-Aguilar et *al.*, (2003). Les mesures sont effectuées au grossissement (10 x et 40 x) qui permet de mieux distinguer le pourtour de la spore.

Les paramètres systématiques de la paroi des spores et des hyphes de rattachement (l'épaisseur et la structure lamellaire de la paroi, la forme de la zone d'attachement de la spore à l'hyphe, l'épaisseur de l'hyphe et la structure de la paroi de l'hyphe) sont aussi notés.

La détermination morpho-typique des espèces est réalisée en se basant sur les classifications décrites par Hall (1984), Schenck et Pérez (1987) ainsi que Morton et Benny (1990).

Les descriptions originales des espèces ainsi que les descriptions fournies sur la base de données **INVAM (2016)**, sont utilisées comme référence pour réaliser l'identification. Les caractères morphologiques des spores sont comparés avec ceux des spécimens-types et des souches de références.

5.1.3. Indices écologiques

5.1.3.1. Abondance relative des CMA

La communauté de CMA des échantillons de chaque sol est estimée (par comptage direct sous la loupe binoculaire) par le nombre de spores présentes dans 100 g de sol.

L'abondance relative de chaque genre ou espèce est calculée comme étant le nombre de spores de ce genre divisé par le nombre total.

5.1.3.2. Fréquence d'occurrence (FO)

Elle est calculée comme étant le nombre d'échantillons dans lesquels des spores d'une espèce particulière sont récupérées et exprimée en pourcentage.

5.1.3.3. Indice de Shannon

Permet d'exprimer la diversité en prenant en compte le nombre d'espèces et l'abondance des individus au sein de chacune de ces espèces :

$$H' = -\sum_{i=1}^S P_i \ln P_i \quad \text{avec :}$$

p_i : abondance relative de l'espèce, $P_i = n_i/N$;

S : nombre total d'espèces ;

n_i : nombre d'individus d'une espèce dans l'échantillon ;

N : nombre total d'individus de toutes les espèces dans l'échantillon.

5.1.4. Caractérisation biochimique des CMA

5.1.4.1. Extraction des acides gras (AG)

Les AG sont extraits selon la méthode de Bligh & Dyer modifiée par Frostegård et al., (1991). L'extraction passe par les étapes suivantes :

Ajout de 10 ml de la solution Bligh and Dyer (250 ml de chloroforme + 500 ml de méthanol + 200 ml de tampon citrate) à 5 g de sol lyophilisé (03 répliques de chaque

région). Après agitation pendant 15 secondes, les tubes sont laissés au repos pendant 2 h à température ambiante. Les échantillons sont centrifugés à 3000 tr/min pendant 10 minutes et le surnageant est transféré à un autre tube à essai (50 ml). La phase contenant les lipides est séparée en ajoutant 4 ml de chloroforme et 4 ml de tampon citrate. Après agitation pendant 1 minute, les échantillons sont laissés au repos toute une nuit à température ambiante. La phase supérieure est transférée dans un tube à essai en verre et le chloroforme est ensuite évaporé sous vapeur d'azote à 40 °C.

4.1.4.2. Trans-estérification et analyse des acides gras

Les échantillons sont dissouts dans 1 ml de Toluène/Méthanol (1:1) et mélangé à l'aide d'un vortex. 1 ml de KOH (0,2M) préparé dans du méthanol est ajouté aux échantillons. Ces derniers sont incubés à 37 °C dans un bain-marie pendant 15 minutes. Les échantillons sont laissés se refroidir pendant 20 minutes. 2 ml d'Hexane/Chloroforme (4:1) + 0,3 ml d'acide acétique (1M) + 2 ml d'eau ultra pure sont ajoutés aux échantillons. Après agitation, les échantillons sont centrifugés à 3000 tr/min pendant 5 minutes. La phase supérieure de chaque échantillon est transférée dans un tube en verre à l'aide d'une pipette Pasteur et évaporés sous vapeur d'azote à 40 °C.

Les échantillons secs sont dilués dans 100 µl d'Hexane et agités pendant quelques secondes avant leur analyse par chromatographie en phase gazeuse (CPG) avec de l'hydrogène comme gaz vecteur (3,6 ml min⁻¹). Le programme de température comprenait une montée rapide de 50 °C à 150 °C à 15 °C min⁻¹ puis une montée de 150 à 220 °C à 5 °C min⁻¹. La quantification des acides gras a été effectuée en utilisant l'ester méthylique d'acide nonadécanoïque (C19: 0) comme standard interne. Leur identification s'est appuyée sur les temps de rétention d'un large éventail d'étalons (mélanges d'esters méthyliques d'acides gras C4 – C24: 1) et l'analyse de masse. Le système a fonctionné à vitesse linéaire constante (70 cm s⁻¹) en utilisant de l'hélium comme gaz vecteur. Les acides gras ont été identifiés en comparant leurs spectres de masse avec les spectres de masse standard dans la bibliothèque NIST MS.

5.1.4.3. Analyse de l'ergostérol

Trois répliques de 4 g de sol lyophilisé, de chaque site étudié, sont analysés pour leur teneur en ergostérol libre, afin d'estimer le niveau de champignons mycorhiziens vivants. L'ergostérol est extrait dans 5 ml de méthanol dans l'obscurité. Les échantillons sont mélangés au vortex pendant 1 min, extraits pendant une nuit et ensuite chauffés au reflux à 70 ° C pendant 90 min. Après refroidissement, 1 ml de H₂O et 2 ml de cyclohexane ont été ajoutés (Yuan et *al.*, 2008).

Les échantillons sont mélangés au vortex pendant 20 s, puis centrifugés pendant 5 min à 3000 tr / min. Après élimination de la phase supérieure, l'ergostérol est extrait de la fraction de méthanol avec 1,5 ml de cyclohexane supplémentaire. Le cyclohexane est ensuite évaporé. Les extraits finaux sont analysés à l'aide d'un CPG équipé d'un détecteur à ionisation de flamme (Norwalk, CT) et d'une colonne capillaire HP5. Les teneurs en ergostérol dans les échantillons de sol sont mesurées en utilisant une courbe étalon standard de différentes dilutions d'ergostérol. Les conditions d'analyse par CPG sont les mêmes que celles utilisés pour l'analyse des acides gras.

5.1.5. Caractérisation moléculaire des CMA

5.1.5.1. Culture monospore des CMA

Des cultures mono-spécifiques des dix morphotypes des CMA les plus abondantes sont établies dans des pots de sable de rivière désinfectés avec des semis de *Plantago lanceolata*. Les graines de cette plante sont désinfectées en surface par trempage dans l'éthanol (70°), pendant 30 s, puis dans l'eau de javel (4 %) pendant 2 min, suivi de deux rinçages dans de l'eau distillée stérile. Une fois désinfectées, les graines sont semées dans du terreau stérilisé et placés sous serre pour germination.

Des spores apparemment saines de chaque morphotype CMA sont utilisées comme inoculum en les plaçant sur la racine des semis immédiatement avant la transplantation. Les plantules sont transplantées dans chaque pot, contenant 1,5 kg de sable de rivière désinfectés. 03 pots par morphotype sont créés, résultant en 30 pots ouverts.

Tous les pots sont maintenus en serre pendant deux mois et arrosés tous les deux jours à l'aide de l'eau du robinet.

5.1.5.2. Extraction et amplification d'ADN

Les spores sont extraites par tamisage humide suivi d'un gradient de centrifugation selon les protocoles adoptés par Gerdmann et Nicolson (1963) et par Giovanetti (1991). Par la suite les spores sont nettoyées avec de la streptomycine (10 mg / ml) pendant 20 s.

L'extraction de l'ADN est réalisée à partir d'une cinquantaine de spores en utilisant le mini kit DNeasy Plant (Qiagen), en suivant le protocole du fabricant (Annexe 1).

Les réactions de Polymérisation en Chaîne (PCR) sont effectuées en utilisant deux amorces spécifiques ciblant un fragment d'ADNr SSU de ~ 550 pb de long sensu (Öpik et al. 2013). Les séquences des deux amorces sont les suivantes :

- NS31 (5' TTGGAGGGCAACTCTGGTGCC 3') (Simon et *al.*, 1992) ;
- AML2 (5'-GAACCCAAACACTTTGGTTCC3') (Lee et *al.*, 2008).

Un volume réactionnel fixé à 25 µl contient pour chaque échantillon :

- 13,875 µl d'eau distillée stérile
- 5 µl de tampon 5X coloré (Mgcl₂ + Tampon 10X)
- 2µl de dNTP (2,25 mM)
- 1 µl de chaque amorce à 20 pmol
- 0,125 µl de Taq polymérase
- 2 µl de matrice d'ADN de l'échantillon à étudier

L'amplification est réalisée dans les conditions suivantes :

Dénaturation initiale à 95°C pendant 5 min.

Dénaturation : 95°C pendant 1 min

Hybridation : 50°C pendant 1 min

Elongation : 72°C pendant 1 min

Elongation finale : 57°C pendant 10 min

Nombre de cycles : 35

Les produits d'amplification sont mis en évidence par électrophorèse sur un gel d'Agarose à 1%. Un marqueur moléculaire de 100 Pb a servi de contrôle de poids moléculaire. Le gel est observé sous lumière UV puis photographié (Brody et Kern, 2004).

5.1.5.3. Séquençage et analyse phylogénétique

Après purification du produit PCR par un Kit PCR CleanUp (Qiagen) en suivant les recommandations du fabricant (Annexe 1), l'ADN est ensuite quantifié à l'aide de spectrophotomètre (Nanodrop) puis séquencé dans le centre *REFGEN Biyoteknoloji*, Ankara, Turquie.

Les produits de séquençage sont analysés en utilisant le programme Finch TV 1.4.0. La recherche de séquences chimériques est réalisée en utilisant le programme *RDP Chimera Check*. Au total, 3 séquences sont identifiées comme chimériques et sont écartées de notre analyse. Les séquences sont comparées en utilisant le programme BLAST (NCBI ; www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/index) (Altschul et al, 1997).

L'analyse phylogénétique est réalisée en utilisant la méthode du maximum de vraisemblance mise en œuvre dans le programme *Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA -X)*. La séquence de *Mortieriella polycephala* (AF157197) est utilisée comme "*outgroup*". Les différents phylotypes sont définis comme des groupes de séquences étroitement apparentées, généralement avec un haut niveau de similitude dans les analyses phylogénétiques (supérieure à 97 %) (Kumar et al., 2018).

5.2. Caractérisation des champignons à partir des racines

5.2.1. Isolement des endophytes racinaires

L'isolement est effectué, selon la méthode décrite par Huang et al. (2007). Les fragments racinaires sont placés aseptiquement dans des boîtes de Pétri contenant un milieu de culture standard PDA stérilisé et supplémenté avec 15 ml/l de treptomycine (0,1%) pour inhiber la croissance bactérienne, à raison de 3 racines/boîte répétée 3 fois. Une fois ensemencées, les cultures sont incubées à l'obscurité dans une étuve à 24° C, pendant 7 jours où un contrôle quotidien a été effectué afin de suivre le développement des mycéliums résultants. Les mycéliums développés sont observés, transplantés dans

un nouveau milieu pour purification. Chaque champignon développé sur les fragments des racines est isolé, purifié par des repiquages successifs pour l'identification et conservé sur milieu PDA à 4° C.

5.2.2. Identification des isolats fongiques

Les champignons isolés sont identifiés par des méthodes morphologiques et moléculaires.

4.2.2.1. Identification morphologique

L'identification a été faite à l'œil nu, en se basant essentiellement sur les caractéristiques des cultures telles que l'aspect général de la surface de la colonie, sa texture et sa pigmentation dans trois milieux de cultures : MEA, CYA, CREA (Suryanarayanan et al., 2003).

Une caractérisation microscopique (observation sous microscope) a été réalisée en tenant compte des caractères morphologiques des hyphes : cloisonnement, coloration et des formes reproductrices : fructifications, formes et couleurs des spores (Kim et Baek, 2011), et en se référant également à la clé d'identification de Barnett et Hunter (1998).

5.2.2.2. Identification moléculaire

a. Extraction et amplification d'ADN

L'extraction de l'ADN est effectuée à partir du mycélium de la surface des souches âgées de 7 jours sur un milieu PDA. L'ADN est isolé par le kit d'extraction d'ADN Kit DNeasy Plant (Qiagen) conformément aux recommandations du fabricant (Annexe1). La pureté et la quantité d'ADN sont vérifiées par électrophorèse sur gel d'agarose et par spectrophotomètre (NanoDrop).

Les séquences fongiques sont amplifiées en utilisant des amorces ciblant un fragment de la région ITS de 550–650 pb de long. Les séquences des amorces utilisées sont :

- ITS1F (5'-CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA-3') ;
- ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') (White et al., 1990)

Les PCR sont effectuées dans un volume final de 25 µl, contenant :

- 13,875 µl d'eau distillée stérile
- 5 µl de tampon 5X coloré (Mgcl₂ + Tampon 10X)
- 2µl de dNTP (2,25 mM)
- 1 µl de chaque amorce à 20 pmol
- 0,125 µl de Taq polymérase
- 2 µl de matrice d'ADN de l'échantillon à étudier

Les conditions étaient les suivantes :

- Dénaturation initiale à 94°C pendant 4 min.
- Dénaturation : 94°C pendant 45s
- Hybridation : 52°C pendant 45s
- Elongation : 72°C pendant 1 min 30s
- Elongation finale : 72°C pendant 10 min
- Nombre de cycles : 35

Toutes les réactions de PCR sont effectuées (en triple pour chaque échantillon d'ADN extrait) dans un thermocycleur Eppendorf PCR.

Les produits de PCR sont examinés sur un gel d'agarose à 1% (p:v) avec une coloration au bromure d'éthidium dans et par rapport à une échelle d'ADN de 100 pb.

b. Séquençage et analyse phylogénétique

Après purification du produit PCR par un Kit PCR CleanUp (Qiagen) en suivant les instructions du fabricant (Annexe 1). Le séquençage a été effectué par le centre *REFGEN Biyoteknoloji*, Ankara, Turquie.

Les produits de séquençage ont été analysés de la même façon décrite précédemment pour l'analyse des séquences des CMA.

5.3. Analyse métagénomique de la communauté fongique endoracinaire

5.3.1. Extraction et amplification d'ADN

05 échantillons racinaires, de chaque région, ont servi pour l'extraction de l'ADN fongique.

L'ADN a été extrait à partir des racines fraîches après stérilisation de surface des racines par trempage dans l'hypochlorite de sodium (à 3 % pendant 3 min) et d'éthanol (à 70° pendant 1 min) puis rinçage (deux fois pendant 1 min) dans de l'eau distillée stérile. Pour chaque échantillon de racine, l'ADN fongique est extrait en utilisant le kit d'ADN génomique (Nucleo Spin Soil). Le protocole du fabricant a été modifié en broyant 250 mg de racines dans un mortier à pilon contenant 700 µl de solution de lyse avant son transfert dans un tube Eppendorf et incubés à 70 ° C pendant 10 min (annexe 1). Pour étudier l'effet de la dilution de l'ADN sur les inhibiteurs de PCR, après extraction, l'ADN a été dilué 1: 1 ; 1:10 ; 1:20 et 1: 100 avec de l'eau ultra pure, afin d'obtenir de l'ADN contenant moins d'inhibiteurs de PCR.

Les séquences fongiques ont été amplifiées en utilisant les amorces ITS1F-ITS4 (White et *al.*, 1990) ciblant un fragment de la région ITS de 550–650 pb de long. Les PCR ont été effectuées dans un volume final de 25 µl, contenant :

12,5 µl de PPP Master Mix (Top-Bio, Prague, République tchèque)

1 µl de chaque solution d'amorce (10 µM),

1 µl de matrice d'ADN

9,5µl d'ultra- eau pure.

La programmation des cycles de la PCR était comme suit :

Dénaturation initiale à 94°C pendant 4 min.

Dénaturation : 94°C pendant 45s

Hybridation : 52°C pendant 45s

Elongation : 72°C pendant 1 min 30s

Elongation finale : 72°C pendant 10 min

Nombre de cycles : 35

Toutes les réactions de PCR ont été effectuées (en triple pour chaque échantillon d'ADN extrait) dans un cycleur Eppendorf PCR.

Les produits de PCR ont été examinés sur un gel d'agarose à 1% (p/v) avec une coloration au bromure d'éthidium dans et par rapport à une échelle d'ADN de 100 pb. Produits de PCR ont été purifiés en utilisant le kit de purification PCR QIAquick® (Qiagen)

5.3.2. PCR nichée des ITS

Les produits de la première PCR ont été dilués au 1 : 100 avec de l'eau ultra pure et utilisés comme ADN matrice pour la deuxième amplification par PCR en utilisant diverses combinaisons entre ITS7 (Ihrmark et *al.*, 2012) et ITS4 (White et *al.*, 1990), y compris Adaptateurs Illumina. Chaque réaction de PCR (25 µl) contenait :

12,5 µl de PPP Master Mix (Top-Bio, Prague, République tchèque)

0,5 µl de chaque solution d'amorce (10 µM),

1 µl de matrice d'ADN

10,5 µl d'eau ultra-pure

La programmation des cycles de la PCR était comme suit :

Dénaturation initiale à 94 ° C pendant 4 min,

Dénaturation à 94 ° C pendant 30 s

Hybridation à 56 ° C pendant 30 s

Extension à 72 ° C pendant 30 s

Extension finale à 72 ° C pendant 10 min.

Nombre de cycle : 25

Les produits de PCR ont été examinés sur un gel d'agarose à 1% (p/v) avec une coloration au bromure d'éthidium en présence d'une échelle d'ADN de 100 pb. Les

produits de PCR ont été regroupés et purifiés en utilisant le kit de purification rapide par PCR QIA (Qiagen). L'ADN a été quantifié avec Nano Drop (Thermo Scientific) et regroupé avant le séquençage.

4.3.3. Séquençage et analyse bio-informatique

Les amplicons ont été séquencés sur la plate-forme Illumina MiSeq 2 × 250 pb dans le laboratoire de biologie fongique, Institut de microbiologie, L'Académie tchèque des sciences, Prague, République Tchèque. La courbe de la superficie des espèces a été générée dans PC ORD version 5 (McCune et Mefford, 2006).

Les données de séquençage ont été analysées dans le logiciel *SEED* (Větrovský & Baldrian, 2013), version 2.0.4. Pour cela, les étapes suivantes ont été effectuées :

Après raréfaction des lectures et démultiplexage des échantillons, après avoir supprimé les séquences de faible qualité (lectures), débruité et exclu les chimères (en utilisant le MOTHUR v.1.34 intégré et USEARCH v. 7.0.1090), les lectures restantes ont été regroupées au niveau de coupure de similitude de 97% (en utilisant les algorithmes MAFFT v. 7.2.15. Et USEARCH intégrés) et les séquences les plus abondantes ont été comparées en utilisant l'outil blast version 2.2.26 + (Altschul *et al.*, 2008). La similarité du séquençage a été comparée aux séquences de la base de données GenBank (séquences environnementales, métagénomiques).

5.3.4. Analyse des données de la métagénomique

Par la suite, toutes les séquences non fongiques ont été éliminées. Pour les analyses statistiques, les singletons globaux (c'est-à-dire les unités taxonomiques opérationnelles (OTU) formés par une seule séquence lue dans tous les échantillons) ont été supprimés de l'ensemble de données.

Pour évaluer l'assemblage de communautés fongiques, nous avons effectué une analyse de l'imbrication basée sur le chevauchement et le remplissage décroissant (métrique NODF) (Almeida-Neto *et al.*, 2008) en utilisant le logiciel *Aninhado* (Guimaraesjr et Guimaraes, 2006). Nous avons utilisé les données présentes et absentes pour calculer la métrique NODF. Les données OTU fongiques présentes et absentes ont

été permutées 1000 fois et leur signification a été évaluée tout en suivant des modèles nuls dans *Aninhado software*. Les valeurs NODF ont été déduites en fonction des valeurs p des modèles nuls.

Pour discerner l'association des OTU fongiques par paires dans les racines des plantes d'arganier prélevées dans les régions d'échantillonnage, une association non aléatoire entre les OTU fongiques a été évaluée.

Afin d'éliminer un biais d'espèce rare, la relation entre les champignons ayant une fréquence relative de 7 a été calculée. La matrice de présence / absence a été randomisée et calculée pour obtenir respectivement les scores Z et les valeurs p. Des valeurs ont été déduites en suivant un modèle nul fixe. Tous les calculs ont été effectués dans le logiciel Pairs (Ulrich, 2008).

6. Analyses statistiques

Toutes les analyses ont été réalisées en triples, et les résultats seront représentés sous forme de moyenne \pm écart type. Les données ont été soumises à l'analyse de la variance (ANOVA) par le logiciel XL-STAT et les différences ont été considérées comme significatives à un seuil de 5%.

Partie II: Etude expérimentale

Chapitre 4.

Résultats et discussions

Chapitre 4 : Résultats et discussions

Dans ce chapitre nous présentons dans un premier temps les résultats de l'analyse des propriétés physico-chimiques des sols des trois sites d'études, suivis de ceux liés à la mise en évidence de la symbiose au niveau des racines d'arganier. Dans un deuxième temps nous donnons successivement les résultats relatifs à la caractérisation morphologique, biochimique et moléculaire d'abord des spores de champignons mycorhiziens arbusculaires (CMA) isolées des sols rhizosphériques puis des champignons endophytes isolés à partir des racines d'arganier. Nous terminons ce chapitre par la présentation de l'analyse métagénomique de la communauté fongique racinaire.

1. Les propriétés physico-chimiques des sols

L'analyse granulométrique des sols rhizosphériques des arganiers des différents sites étudiés, nous a permis de déterminer plusieurs types de texture. Le sol de l'arganier de Chlef s'est montré plus riche en argile (44 %) alors que ceux des autres régions paraissent plutôt riches en sable. En effet, le sol de Tindouf est de texture sableux-limoneux (78,4 %) et celui de Mostaganem est Limon-argilo-sableux (52 %)(tableau 2).

Tableau 2 : Propriétés physico-chimiques des sols de l'arganier par région

Sites d'étude	Chlef	Mostaganem	Tindouf
Limon (%)	20 ± 2,1	20 ± 2,6	14,8 ± 1,8
Argile (%)	44 ± 3,8	28 ± 2,9	6,8 ± 0,8
Sable (%)	36 ± 1,6	52 ± 2,3	78,4 ± 3,2
pH	7,75 ± 0,22	8,12 ± 0,23	8,76 ± 0,14
CE (ms/cm)	0,57 ± 0,14	0,71 ± 0,11	0,89 ± 0,24
Carbone total (%)	1,55 ± 0,06	2,73 ± 0,14	0,28 ± 0,04
Matière organique (%)	2,67 ± 0,1	4,71 ± 0,3	0,48 ± 0,07
Azote total (PPM)	257,00 ± 1,4	366,70 ± 2,6	151,27 ± 1,8
P assimilable (PPM)	13,52 ± 0,59	15,90 ± 0,47	1,74 ± 0,11
Calcaire total (%)	2,85 ± 0,24	3,54 ± 0,32	8,15 ± 0,28

Les résultats du pH des trois sols étudiés se sont montrés très proches et sont légèrement alcalins entre 7,75 et 8,76 (tableau 2).

La conductivité électrique des sols varie selon la région où le lieu d'étude. Elle est de 0,57 ms/cm à Chlef ; de 0,71 ms/cm à Mostaganem et de 0,89 ms/cm à Tindouf (tableau 2). D'après ces résultats et en se référant à la norme Gagnon (1996), les sols rhizosphériques de Tindouf et de Mostaganem sont classés dans la catégorie des sols salés. Par contre, le sol de la région de Chlef est classé dans la catégorie des sols non salés.

Quant au carbone total, la valeur la plus élevée a été enregistrée à Mostaganem avec un taux de 2,73% suivie de Chlef (1,55%) puis de Tindouf (0,28%). La teneur de la matière organique varie elle aussi selon la région d'étude : 0,48% à Tindouf ; 4,71% à Mostaganem et 2,67% à Chlef.

Selon les résultats du tableau 2, le sol de Mostaganem se révèle plus riche en azote total (366,70 PPM) par rapport à ceux de Chlef (257,00 PPM) et de Tindouf (151,27 PPM).

Concernant le taux de phosphore assimilable, la plus forte teneur a été enregistrée dans les sols de Mostaganem (15,90 PPM) suivie de Chlef (13,52 PPM). Le sol le plus pauvre en phosphore assimilable est celui de Tindouf (1,74 PPM).

Quant au calcaire total, c'est le sol de Tindouf qui enregistre la plus forte teneur avec 8,15% contre 3,54% à Mostaganem et 2,85% à Chlef.

En tenant compte de l'ensemble des paramètres mesurés, l'analyse statistique a montré des différences très significatives entre les trois sols étudiés (annexe 2).

Plusieurs études ont montré les effets des paramètres physicochimiques des sols sur la communauté fongique rhizosphérique. Sylvia et Williams (1992) ont montré que la texture des sols (taille des particules constituant le sol) influe sur l'accessibilité de l'air et des nutriments aux microbes. Selon certaines études, les sols sablonneux stimulent le développement de l'association mycorhizienne alors que les sols argileux l'inhibaient. Les sols sableux sont généralement plus poreux, plus chauds, plus secs, et moins fertiles que ceux d'une texture plus fine et ces conditions ont des effets directs et indirects sur les champignons mycorhiziens à arbuscules (CMA) (Jensen, 1994 ; Bending et al. 2002;

Bhupinderpal et *al.* 2006). D'autre part une bonne aération du sol est une condition préalable à un développement optimal des CMA (Saif, 1981).

La différence enregistrée entre les trois zones d'étude peut être attribuée aux conditions climatiques (l'étage bioclimatique) et à la végétation. En effet, selon Boehler (2012) le pH du sol peut varier d'une région à une autre et aussi au cours de l'année sous l'effet des conditions climatiques et la végétation.

La pauvreté des sols de Tindouf en carbone total et en matière organique est expliquée par l'absence des espèces végétales et animales autour des arbres d'arganier. En effet, la matière organique du sol est issue de la décomposition progressive des résidus de culture, et des végétaux, animaux et autres organismes biologiques vivants dans le sol.

La richesse des sols de Tindouf en calcaire total constitue aussi un autre facteur défavorable pour le développement et la croissance de l'arganier. En effet, selon Zitouni (2010) et Labidi et *al.* (2011), le calcaire excessif dans le sol a des effets négatifs sur la colonisation et le nombre des structures mycorhiziennes (arbuscules, vésicules, mycéliums externes et les glomérospores) de *Glomus irregularis* avec un impact négatif sur son cycle de vie, que ce soit durant la phase de pré-symbiotique ou la phase symbiotique dans le système racinaire de *Cichorium tybus* L.

2. Observation de la colonisation mycorhizienne des racines

Les observations microscopiques ont montré que les racines prélevées des arbres d'arganier (*Argania spinosa*) des trois régions sont toutes colonisées par des champignons endomycorhiziens, ectomycorhiziens et endophytes. En effet, la colonisation se manifeste par différentes structures à savoir l'existence d'un réseau important d'hyphes intra et intercellulaires, des vésicules et des arbuscules (Figures : 17 et 18). Ces observations confirment la mycotrophie de l'espèce et sa dépendance aux champignons mycorhiziens arbusculaires (CMA), quelle que soit la région étudiée. De nombreux auteurs rapportent les mêmes observations sur les populations d'arganier Marocain comme Sellal et *al.* (2016), Ouallal et *al.* (2018). Ce genre d'association symbiotique avec des champignons

mycorhyziens n'est pas spécifique à l'arganier. Il a été abondamment décrit sur d'autres espèces ligneuses qui se développent dans des conditions défavorables comme le palmier dattier (Zougari et *al.*, 2011 ; Radi et *al.*, 2014), l'olivier (Meddad-Hamza et *al.*, 2011), le pistachier (Bouabdelli et *al.*, 2019), le Thuya (Abbas et *al.*, 2013), le Cèdre de l'Atlas (Benssasi, 2006).

Les racines concernées par cette étude (diamètre inférieur à 05 mm) sont responsables de l'absorption hydrique et minérale (Baize et Jabiol, 1995). D'après Fortin et *al.*, (2008), la présence des mycorhizes modifie et engendre plusieurs fonctions principales, notamment l'absorption de l'eau et des éléments minéraux, la protection contre les organismes pathogènes et la résistance aux stress environnementaux.

L'augmentation de la quantité d'eau est due au réseau extra racinaire. Cette meilleure alimentation est nécessaire pour une bonne circulation des éléments minéraux (Kane, 1997). L'amélioration de la nutrition hydrique des plantes par l'intermédiaire des mycorhizes a été notée via ce plus grand volume de sol, exploré par les filaments mycorhiziens. Le mycélium se développe d'une manière considérable à l'extérieur, envahissant le sol dans toutes les directions. Il offre une surface de contact très importante, pénétrant beaucoup plus aisément que la plus fine des racines, dans les moindres interstices du sol (Augé, 2001). Concernant l'absorption des éléments minéraux, les excretions d'acide oxalique par les filaments mycéliens seraient le moteur principal de la solubilisation des phosphates calciques. Il en résulte la libération de l'orthophosphate assimilable par les racines (Plenchette et *al.*, 2005).

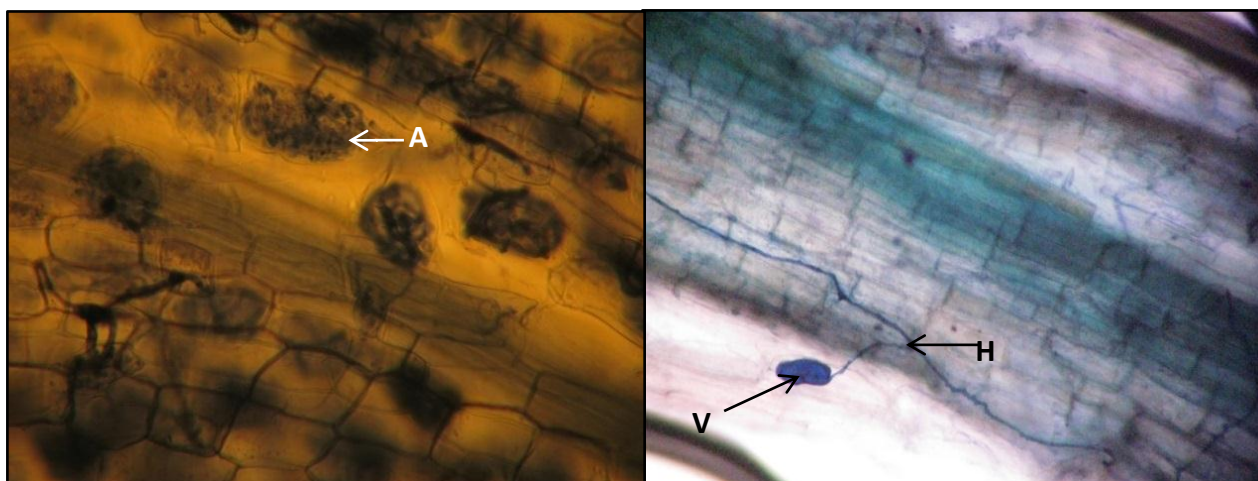


Figure 17 : Racines d'arganier mycorhizées présentant des arbuscules (A), des hyphes (H) et des Vésicules (V) (Grossissement : 1000 x)

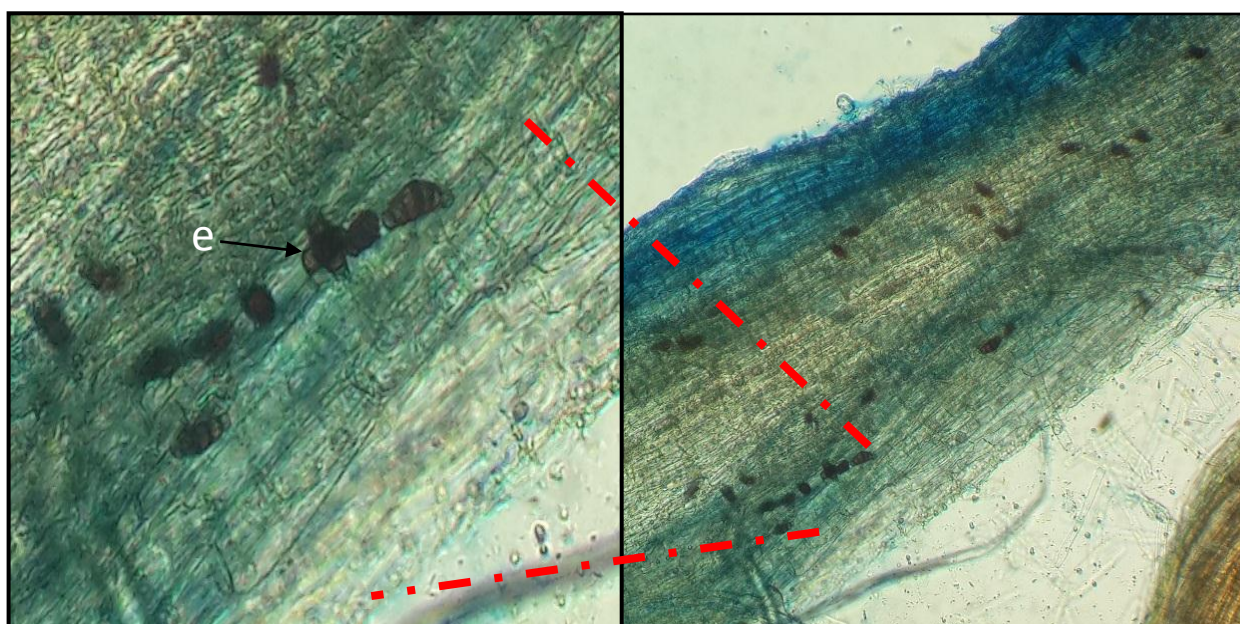


Figure 18 : Racine d'Arganier présentant des endophytes (e : endophyte) (Grossissement : 1000 x)

2.1. Quantification de l'association mycorhizienne

L'examen des racines de l'Arganier au microscope a montré que tous les échantillons sont densément colonisés par des champignons mycorhiziens arbusculaires (CMA).

Le taux ou la fréquence de mycorhization "F" dans les racines de l'arganier a atteint les 98% à Tindouf, 95 % à Chlef et 87 % à Mostaganem (Figure 19). Ces résultats sont comparables à ceux rapportés par Sellal et *al.* (2016) sur l'Arganier du Maroc où les taux de mycorhization ont varié selon la zone d'étude : 100 % dans la région de Taroudant

Toufalazte et entre 50 % et 33,33 % dans les régions de Tamanar, d'Ait Melloul et de Tiznit.

De même, nos résultats corroborent avec ceux trouvés par Abbas (2014) chez les racines récoltées dans les tétraclinaies d'Oued Beht, Korifla (Maroc) où les taux ont atteint les 100%. D'autre part, Liman (2014) à concéderait la colonisation comme étant importante chez *Cynanchum acutum*, *Daucos carotta* et *Sonchuso leraceus* où elle est estimée à 93.33%, 95% et 90 % respectivement.

Pour l'intensité de mycorhization "M", qui exprime les proportions effectives de racines mycorhizées, elle ne présente pas une grande différence entre les zones étudiées. L'intensité de mycorhization était de (61,44%) à Tindouf, de (58.2 %) à Chlef et de (56.7 %) à Mostaganem (Figure 19).

La teneur en arbuscules "A" varie d'un échantillon à un autre et d'un site à un autre. Les teneurs en arbuscules « A » contenue dans les échantillons de Tindouf, de Chlef et de Mostaganem paraissent très proches avec respectivement 43,66% et 42.5 % et 40,3%(Figure 19).

L'analyse de la variance n'a montré aucune différence significative entre les trois régions en termes des paramètres mesurés (fréquence, intensité de mycorhization et teneur en arbuscules).

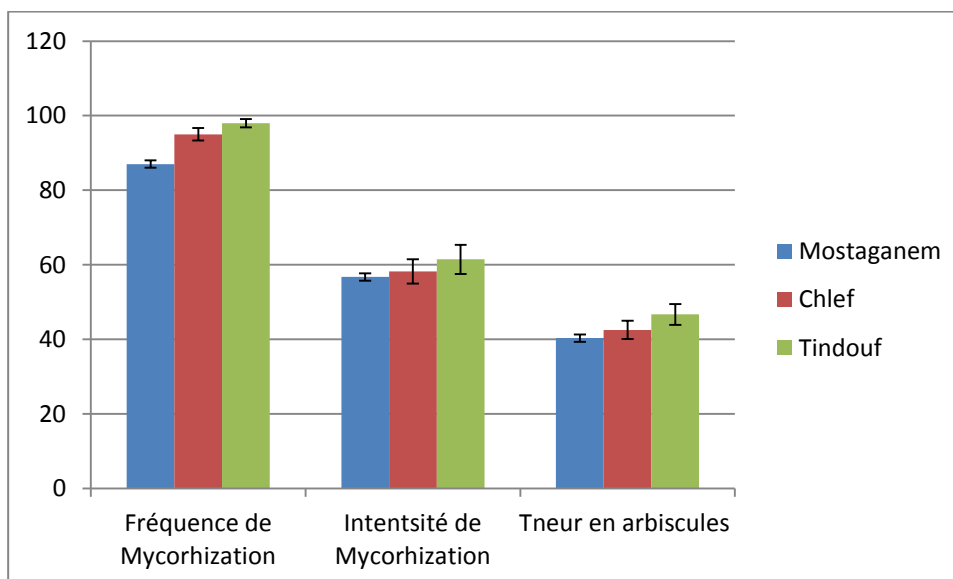


Figure 19 : Quantification du statut mycorhiziens des racines d'arganier.

La diversité des fréquences de colonisation et la densité de la communauté myco-endophyte au niveau des racines varient selon les conditions climatiques et édaphiques, l'hétérogénéité de l'habitat et des caractéristiques physico-chimiques des sols, notamment la teneur en phosphore assimilable, le taux de la matière organique, la teneur en calcaire actif et même la salinité.

Dans notre étude, l'analyse statistique des corrélations a permis de mettre en évidence une corrélation négative entre la fréquence de mycorhization et la teneur en phosphore ($r = -0,758$). Ces résultats confirment ceux de Dupré et al. (1993), Puttsepp et al. (2004) et Garcia-Motero et al. (2009), qui ont confirmé que la carence en phosphore du milieu favorise la colonisation des champignons mycorhiziens.

3. Caractérisations des CMA isolées à partir du sol

3.1. Caractérisation morphologique des spores

L'observation des spores sous microscope (au grossissement 100x et 400x) a permis de distinguer un total de 16 morphotypes de CMA isolés à partir de la rhizosphère d'*Argania spinosa* des trois régions d'étude.

L'identification des espèces a été faite par comparaison de ces caractéristiques avec les travaux de Hall (1984), Schenck et Pérez (1987), Morton et Benny (1990), Azcon-Aguilar et al. (2003) et la base de données INVAM.

3.1.1. Morphotype 01 (*Glomus constrictum*)

Les spores sont de forme globuleuse à sub-globuleuse rarement irrégulière de couleur rouge brun à presque noire avec des tailles variantes entre 115 et 136 μm . La paroi de la spore est composée de 2 couches. La première n'est présente que chez les spores jeunes (mais pas âgées). La seconde est stratifiée de couleur orange brun à rouge noir foncé. Les hyphes d'attachement sont de forme cylindrique et rétrécies (Figure 20 a).

3.1.2. Morphotype 02 (*Glomus mosseae*)

Les spores sont globuleuses à Sub-globuleuses de diamètres d'environ 145 µm de couleur paille ou jaune brun, avec des parois composées de trois couches. La première est une couche mucilagineuse et hyaline se colorant en rouge blanc dans le réactif de Melzer. La seconde est lisse, rarement présente dans les spores matures. La troisième, est stratifiée, de couleur jaune pâle à jaune doré. L'hyphe d'attache est en forme d'entonnoir de couleur jaune pâle. Leurs parois, composées de 3 couches, sont en continuités avec les couches de la paroi de la spore (Figure 20b).

3.1.3. Morphotype 03 (*Glomus clarum*)

Cette espèce est caractérisée par des spores de couleur jaunâtre et de forme ovales avec un aspect globuleux à sub-globuleuse. Leurs diamètres varient entre 136 et 162 µm. Les spores ont une couche hyaline gélatineuses, qui avec le avec le temps, lui donne un aspect rugueux. Avec le réactif de Melzer, ces spores deviennent plus sombres (Figure 20c).

3.1.4. Morphotype 04 (*Glomus versiforme*)

Spores de forme variable (globuleux, sub-globuleux, ovoïde, parfois cylindrique, légèrement évasée), de couleur jaune pâle, jaune orangé ou brun rougeâtre. Les spores sont attachées à des hyphes à paroi mince. La taille des spores est également variable : de 103 à 120µm de diamètre. La paroi se compose d'une seule couche sombre d'environ 05 µm d'épaisseur (Figure 20 d).

3.1.5. Morphotype 05 (*Glomus etunicatum*)

Grosses spores de taille de 195 µm de diamètre ayant une paroi à deux couches. La couche externe est rarement rencontrée chez les spores matures. La couche interne devient plus sombre à mesure qu'elle vieillit (Figure 20 e).

3.1.6. Morphotype 06 (*Glomus intraradices*)

Les spores sont de formes globuleuses à sub-globuleuses de diamètre moyen de 145µm et de couleur jaune pâle à jaune grisâtre avec une hyaline lorsqu'elles sont jeunes. Les spores sont soit isolées ou associées en agrégats d'une centaine de spores. La paroi de la spore est constituée de trois couches. La première est une couche mince

mucilagineuse, la seconde est semi-permanente de couleur hyaline et la troisième est épaisse stratifiée de couleur jaune pâle à jaune grisâtre (Figure 20f).

3.1.7. Morphotype 07 (*Glomus proliferum*)

Les spores sont de formes globuleuses à sub-globuleuses rarement ovoïde de diamètre moyen de 165 μm , de couleur jaune claire à jaune grisâtre. La paroi de la spore est constituée de trois couches (Figure 20 g).

3.1.8. Morphotype 08 (*Glomus rubiformis*)

Les spores sont de forme globuleuse à sub-globuleuses de couleur rouge brun avec une taille de 156 μm . La paroi de la spore est composée de 2 couches (Figure 20 h).

3.1.9. Morphotype 09 (*Glomus sp1*)

Les spores de forme globuleuses de taille d'environ 184 μm , de couleur jaune claire formant des grappes. Ce type de spore est entouré par deux parois bien distinctes (Figure 20 i).

3.1.10. Morphotype 10 (*Glomus sp2*)

Les spores de cette espèce sont sphériques de grande taille (208 μm en moyenne) et de couleur rouge foncé avec trois parois, les deux couches de l'extérieur sont minces mais celle de l'intérieur est large. Le contenant de la spore est sombre soit marron foncé ou noir, avec un hyphes d'attache cylindrique rétréci (Figure 20 j).

3.1.11. Morphotype 11 (*Acaulospora tortuosa*)

Les spores se développent latéralement sur le col de saccules sporifères. Elles sont globuleuses, à sub-globuleuses, de 153 μm de diamètre. Elles sont de couleur brun jaune à jaune orangé à l'âge jeune, devenant brun orangé avec l'âge. Elles ont trois parois dont les couches ne tachent pas dans le réactif de Melzer.

La paroi de ces spores se compose de deux couches. La couche extérieure est de couleur sub-hyaline à jaune pâle. La couche intérieure est brune jaune à jaune orangé chez les spores jeunes, et brun orangé chez les spores âgées (Figure 20 k).

3.1.12. Morphotype 12 (*Acaulospora delicata*)

Les spores sont sub-globuleux de couleur hyaline à jaune pâle avec une teinte verte, avec deux couches. Ces spores ont une taille d'environ 132 μm (Figure 20 l).

3.1.13. Morphotype 13 (*Acaulospora denticulata*)

Les spores sont de forme ovale globuleuse et sub-globuleuse, de couleur orange-brun pâle et brun-orangé foncé, avec une gamme de couleur intermédiaire. La paroi est constituée d'une seule couche. Cette espèce a une taille variant entre 112 et 138 μm (Figure 20 m).

3.1.14. Morphotype 14 (*Gigaspora* sp)

Ce morphotype est caractérisé par des spores de couleur marronclair et la présence trois parois dont la plus externe est hyaline. Ces spores sont toujours liées au mycelium d'attachement. Elles sont de taille d'environ 262 μm (Figure 20 n).

3.1.15. Morphotype 15 (*Scutellospora* sp)

Cette espèce est caractérisée par des spores ayant un hyphe étendu à la sortie de la spore, avec la présence d'un bouclier de germination. La taille de ces spores est d'environ 145 (Figure 20 o).

3.1.16. Morphotype 16 (*Entrophospora* sp)

Ce morphotype est caractérisé par des spores globuleuses d'environ 168 μm de diamètre. Les parois de ces spores sont composées de deux couches : la couche extérieure est hyaline et la couche intérieure est jaune – brune (Figure 20 p).

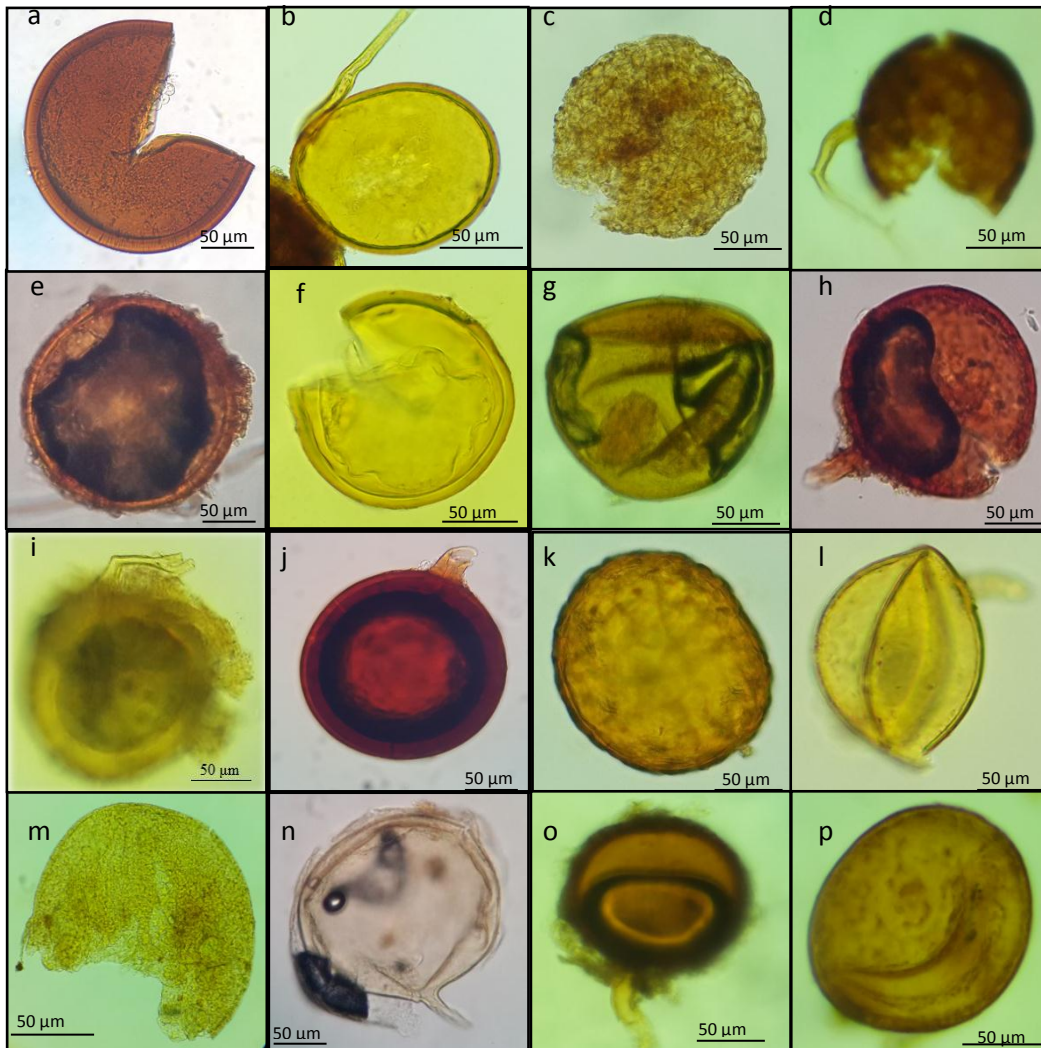


Figure 20: Structures des espèces isolées des trois sites d'étude (a : *Glomus constrictum* , b : *Glomus mosseae*, c : *Glomus clarum*, d : *Glomus versiformes*, e : *Glomus etunicatum*, f : *Glomus intraradice*, g : *Glomus proliferum* , h : *Glomus rubiformis* , i : *Glomus* sp1, j : *Glomus* sp 2, k : *Acaulospora tortuosa*, l : *Acaulospora denticulata*, m : *Acaulospora delicata* , n : *Gigaspora* sp, o : *Scutellospora* sp, p : *Entrophospora* sp

3.2. Variation quantitative des spores

Au total 16 espèces ont été isolées à partir des trois sites d'études. Elles appartiennent aux genres *Glomus*, *Acaulospora*, *Gigaspora*, *Scutellospora*, *Entrophospora* (Figure 21).

Le genre *Glomus* a été observé avec une abondance relative variant de 62% (Tindouf) à 75% (Mostaganem) suivi du genre *Acaulospora* (avec une abondance relative entre 11%

(Mostaganem) et 25% (Tindouf). Les genres *Scutellospora* et *Entrophospora* ont une abondance relative qui varie de 4 à 7% dans les trois sites d'étude.

Le genre *Gigaspora* représenté par une seule espèce a été rencontré exclusivement dans la région de Mostaganem avec une abondance relative de 5%.

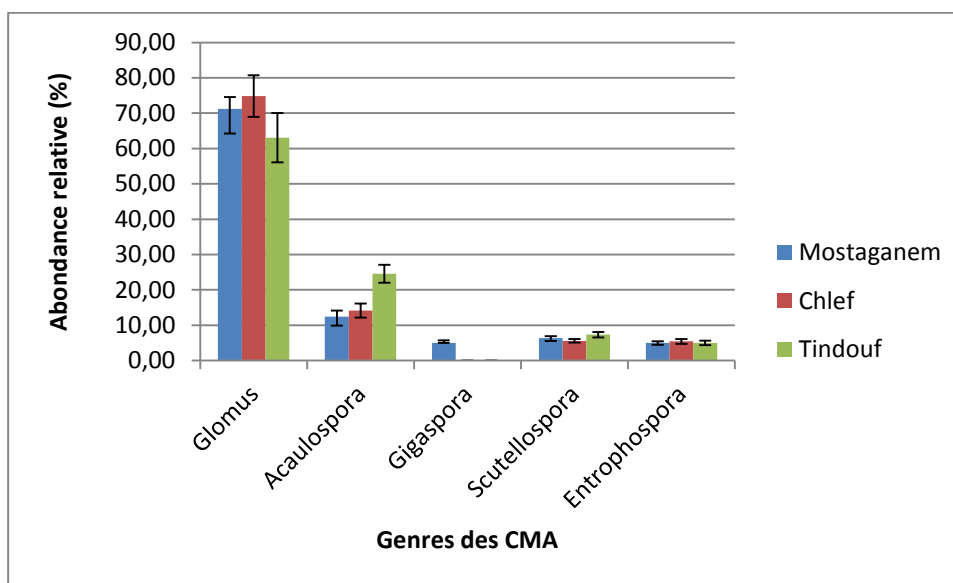


Figure 21 : Abondance relative des genres des CMA isolées

Le nombre d'espèces répertoriées varie selon le site ou la région d'étude. On dénombre 12 espèces à Tindouf, 13 espèces à Chlef et 14 espèces à Mostaganem. Les espèces *Glomus rubiformis* et *Gigaspora sp* ont été identifiés exclusivement dans la région de Mostaganem, tandis que *Acaulospora delicata* était présent uniquement à Tindouf (Tableau 3).

Dans la région de Mostaganem, *Glomus constrictum*, *Glomus mosseae*, *Glomus clarum*, *Glomus intraradices* et *Acaulospora tortuosa* représentaient les espèces les plus abondantes, avec une fréquence d'occurrence de 80%. Aucune présence de *Glomus etunicatum* et *Acaulospora delicata* n'a été décelée.

Dans la région de Chlef, les deux espèces : *Glomus proliferum* et *Glomus sp1* sont présents dans 80% des échantillons analysés. Par contre, aucune présence des genres *Glomus rubiformis*, *Acaulospora delicata* et *Gigaspora sp*, n'a été signalée.

Dans la région de Tindouf deux espèces notamment *Glomus constrictum* et *Glomus etunicatum*, marquent fortement leurs présences (présents dans 80% des échantillons analysés). En revanche *Glomus versiforme*, *Glomus rubiformis*, *Glomus sp 2* et *Gigaspora sp* n'ont été pas décelés dans cette région (Tableau 3).

Tableau 3 : Fréquence d'occurrence (%) des espèces des CMA isolées des trois sites d'étude

	Espèces des CMA	Mostaganem	Chlef	Tindouf
Morphotype 01	<i>Glomus constrictum</i>	80	60	80
Morphotype 02	<i>Glomus mosseae</i>	80	40	60
Morphotype 03	<i>Glomus clarum</i>	80	20	60
Morphotype 06	<i>Glomus versiforme</i>	60	60	0
Morphotype 05	<i>Glomus etunicatum</i>	0	40	80
Morphotype 04	<i>Glomus intraradices</i>	80	40	40
Morphotype 07	<i>Glomus proliferum</i>	60	80	20
Morphotype 08	<i>Glomus rubiformis</i>	40	0	0
Morphotype 09	<i>Glomus sp1</i>	20	80	80
Morphotype 10	<i>Glomus sp 2</i>	60	60	0
Morphotype 11	<i>Acaulospora tortuosa</i>	80	40	40
Morphotype 12	<i>Acaulospora denticulata</i>	40	60	60
Morphotype 13	<i>Acaulospora delicata</i>	0	0	40
Morphotype 14	<i>Gigaspora sp</i>	60	0	0
Morphotype 15	<i>Scutellospora sp</i>	40	60	60
Morphotype 16	<i>Entrophospora sp</i>	20	20	80
Nombre total des espèces		14	13	12

Le nombre total des spores était significativement différent entre les trois sites d'étude ($P=0,0001$). En effet il a atteint 56,29/100 g du sol à Mostaganem, 38,49/100 g à Chlef et 21,66/100 g à Tindouf (Tableau 4).

D'autre part, les valeurs de l'indice de Shannon varient de 2,474 à 2,619 et aucune différence significative n'a été enregistrée entre les indices de Shannon dans les trois sites d'étude ($P=0,234$). Cela confirme la diversité des espèces des CMA dans les trois régions.

Tableau 4 : Variation du nombre de spores (/100 g du sol) et l'indice de Shannon

	Mostaganem	Chlef	Tindouf
Nombre total des spores	56,29 ± 3,45	38,49 ± 4,78	21,66 ± 3,67
Indice de Shannon	2,619	2,602	2,474

L'analyse statistique de nos résultats a révélé l'existence de corrélations positives entre le nombre total des spores et la teneur en carbone total ($r=0,992$), matière organique ($r=0,992$), l'azote ($r=0,987$) et le phosphore assimilable ($r=0,907$).

Il existe aussi, quelques corrélations négatives entre le nombre total des spores et le pH ($r= -0,526$), la conductivité électrique ($r=0,565$) et le taux de calcaire ($r= -0,757$).

Beaucoup de similitudes existent entre nos résultats et ceux rapportés par Sellat *et al.* (2016). En effet, selon cet auteur, 26 espèces de CMA appartenant aux genres *Glomus*, *Scutellospora*, *Entrophospora*, *Pacispora*, *Gigaspora*, ont été identifiées dans la rhizosphère d'arganier de plusieurs régions du Maroc. D'autre part, Nouaim et Chaussod (2012) ont mis en évidence plusieurs espèces de CMA appartenant aux genres *Glomus*, *Gigaspora*, *Scutellospora* avec une nette dominance en espèces du genre *Glomus*. Aussi, dans ses travaux, Ouallal *et al.* (2018) signalent avoir identifié six espèces appartenant aux genres *Glomus* et *Scutellospora* associées à l'arganier du sud-ouest Marocain. Ces genres ont été également observés par Abbes (2003) dans la rhizosphère du thuya.

Par ailleurs, plusieurs espèces de CMA appartenant au genre *Glomus* et *Gigaspora*, ont été aussi isolés de sols salins occupés par des plantes de *Tamarix articulata* dans les zones arides et semi-arides en Algérie (Benchrif *et al.*, 2015). Le taux de colonisation totale des racines est resté possible avec la salinité du sol. De plus, la biomasse microbienne de la rhizosphère de *Tamarix articulata* était affectée par la salinité.

Selon Maarouf *et al.* (2015), la densité des spores dans le sol du sable côtier de Terga (nord-ouest d'Algérie) était généralement élevée, mais variable selon la perturbation du sol et les conditions locales. L'étude de la diversité des CMA dans la fraction de sol rhizosphérique a permis de distinguer 11 morphotypes de spores affiliés à quatre genres (*Glomus*, *Scutellospora*, *Gigaspora* et *Acaulospora*) avec une prédominance de *Glomus*. Le même auteur suggère que *Acacia saligna*, *Lotus creticus* et *Pistacia lentiscus* favorisent la symbiose mycorhizienne arbusculaire. La gestion du potentiel des sols mycorhiziens par l'introduction de ces espèces est une approche très prometteuse pour contribuer à la réhabilitation des écosystèmes dégradés. Ils peuvent en outre constituer une source importante d'inoculum de CMA dans les écosystèmes semi-arides.

Les résultats obtenus par Beddiar et *al.* (2015) montrent que toutes les espèces observées dans la rhizosphère des arbres forestiers au Nord-Est Algérien ont soit des ectomycorhizes (ECM), soit des CMA ou les deux à la fois. De plus, les espèces introduites du genre *Acacia* ou *Casuarina* sont porteuses de CMA et également de nodules fixateurs d'azote. Il faut noter la remarquable diversité des morphotypes ectomycorhiziens associés aux pins et aux chênes ainsi que celle des spores de champignons endomycorhiziens présents dans la rhizosphère d'autres espèces.

La diversité et la richesse en CMA pourraient être expliquées par les différences des conditions climatiques entre les trois régions, les paramètres édaphiques notamment la teneur en phosphate assimilable. En effet plusieurs études ont montré que la richesse en ces champignons est fortement influencée par la teneur du sol en phosphore et le pH. Car la majorité des mycorhizes jouent le rôle de fixateur de phosphore (Plenchette, 1982, Smith et Gianinazzi-Pearson, 1988 et De Mars et Broner 1995). De plus la teneur en calcaire peut jouer un rôle négatif sur la richesse et la diversité des champignons mycorhiziens. En effet, Labidi et *al.* (2011) ont rapporté que le calcaire a des effets néfastes sur la colonisation et le nombre des structures mycorhiziennes (arbuscules, vésicules, mycéliums externes et les glomérospores) de *Glomus* avec un impact négatif sur son cycle de vie, que ce soit durant la phase de pré-symbiotique (germination) ou la phase symbiotique dans le système racinaire de *Cichorium tybus* L. D'autre part, les travaux de Benjamin (1989) ont révélé que la composition et de degrés et de couverture végétale jouent un rôle important sur la diversité des CMA. De plus, Zougari-Elwed et *al.* (2012), ont montré que les taux de mycorhization varient en fonction des sites et des saisons et les paramètres environnementaux. Selon Johnson et *al.* (2004), La diversité et la distribution des CMA résultent des processus écologiques temporaires agissant sur les communautés végétales et fongiques, la température, le pH et le niveau de phosphore dans le sol ainsi que le génotype des plantes constituent des facteurs limitant la distribution des espèces de CMA.

3.3. Quantification biochimique des CMA

3.3.1. Analyse des acides gras

En plus de la caractérisation morphologique, l'extraction des lipides et l'analyse des profils d'acides gras est une autre méthode prometteuse pour quantifier les CMA dans les sols (Graham et *al.*, 1995;Olsson, 1999). En effet, les CMA possèdent des acides gras typiques qui les distinguent des autres champignons.

A partir des chromatogrammes (figure 22), nous avons dressé le tableau 5 qui indique les proportions relatives en acides gras obtenues après analyse par CPG.

D'après le tableau 5, l'acide stéarique (C18) est l'acide gras majoritaire dans l'ensemble les échantillons avec des teneurs allant du 37,56% à 39,89 %. Le deuxième acide gras majoritaire est l'acide palmitique avec des teneurs allant de 20,67 à 21,89%. L'acide palmitoléique (C16 :1 ω 5) a été détecté avec des teneurs de 15,34% à 17,51%.

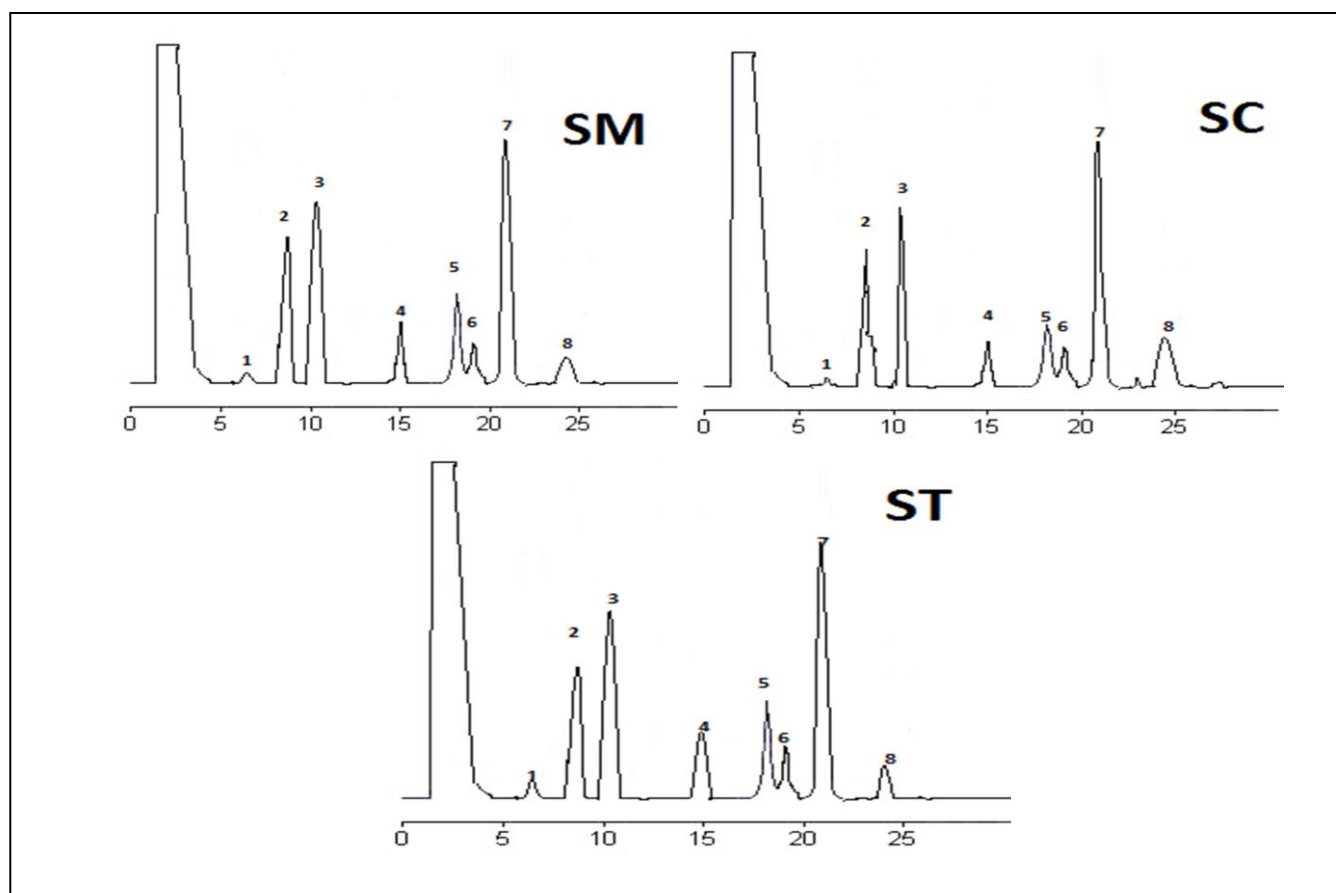


Figure 22: Profils chromatographiques des EMAG extraits des sols rhizosphériques des trois régions (S : sol ; T : Tindouf, C : Chlef ; M : Mostaganem ; 1=C16:1 ω 7, 2=C16:1 ω 5, 3=C16 :0, 4=C18:2 ω 6,9, 5=C18:1 ω 9, 6=C18:1 ω 7, 7=C18:0, 8=C20 :0)

Tableau 5 : Teneur (%) en acides gras extraits des sols rhizosphériques des trois régions

Région Acides gras	Chlef	Mostaganem	Tindouf
C16 : 1ω7	0,89	1,1	1,51
C16 : 1ω5	16,43	17,51	15,34
C16 : 0	21,54	20,67	21,89
C18 : 2ω6,9	4,21	5,56	6,9
C18 : 1 ω9	6,65	7,28	7,78
C18 : 1 ω7	3,32	3,8	2,45
C18 : 0	39,89	37,56	38,78
C20 : 0	4,1	3,08	3,89

Les teneurs des autres acides gras n'ont pas dépassé les 8 % dans l'ensemble des échantillons analysés.

Nos résultats corroborent avec les études effectuées sur l'analyse des acides gras des CMA. En effet Sancholle et Dalpe (1993), Bentivenga et Morton (1994) et Trepanier et *al.*, (2005) ont signalé que la composition des CMA en acides gras présente une large distribution allant de C12 à C26 chez certaines espèces et ils peuvent contenir des acides gras à longues chaînes polyinsaturés comme chez les *Acaulosporaceae*.

D'après les travaux de Grahal et *al.* (1995), les acides gras mono-insaturés sont les acides majoritaires chez tous les CMA et représentent souvent plus de 50%. Selon d'autres auteurs comme Declerck et *al.* (2000), Madan et *al.* (2002) et Trepanier et *al.* (2005), l'acide palmitoléique C16 :1 ω 5 est toujours très bien représenté et sa teneur oscille entre 16 à 89% dans les spores et les vésicules des différentes espèces de *Glomus*.

Nos résultats relatifs aux teneurs en acide plamitiques confirment ceux de la littérature. Selon plusieurs études (Gaspar et *al.*, 1994 ; Bentivenga et Morton 1994,1996; Graham et *al.*, 1995; Declerck et *al.*, 2000), les acides gras saturés majoritaires et caractéristiques chez tous les CMA sont l'acide palmitique C16:0, représentant entre 5 et 42% des acides gras totaux et l'acide stéarique C18:0, présent en plus faible proportion.

En revanche nos échantillons de racines et de sols ont montré des teneurs très élevées en acide stéarique C18 :0 (37,56 à 42,34%).

Benchrifa et *al.* (2015) ont analysé le taux des acides gras phospholipidiques (PLFA) C16: 1 ω 5 ainsi que C15: 0, C16: 0, C17: 0, C18: 1 ω 7 et cy19: 0 ont augmenté dans les sols à forte teneur saline suggérant que l'AMF et les biomasses bactériennes augmentaient avec la salinité.

Olsson et *al.* (1998) ont utilisé la signature en acide gras 16: 1 ω 5 pour évaluer la croissance et les interactions des CMA. Ils ont proposé le 16: 1 ω 5 comme acide gras marqueur de biomasse fongique dans le sol tel que les spores et le mycélium extra racinaire. Cette approche de biomarqueurs a également été adoptée pour les structures mycéliennes au sein des racines végétales pour le stockage d'énergie dans les vésicules et pour les constituants membranaires tels que le mycélium intra-radical ou les arbuscules. Sur cette base, le 16: 1 ω 5 est largement utilisé comme indicateurs pour les CMA dans les écosystèmes du sol (Ngosong et *al.*, 2012).

3.3.2. Analyse de l'ergostérol

En plus des acides gras spécifiques, l'ergostérol est un autre biomarqueur de la biomasse fongique, qui subit une décomposition rapide après la mort des champignons et peut donc être considéré comme un indicateur de la biomasse fongique vivante (Tunlid, 1992). L'ergostérol n'est pas un composant des cellules végétales, ce qui a permis son utilisation comme biomarqueur de mycorhize pour évaluer la mycorhisation des racines avec des CMA, des ectomycorhizes et des mycorhize éricoïdes (Newell et *al.*, 1988 ; Frey et *al.*, 1992).

Les résultats de la figure 23, montrent que les sols des trois régions ont enregistré des teneurs en ergostérol varient de 6,66 μ g/g à Tindouf, 7,33 μ g/g à Chlef et 10,54 μ g/g à Mostaganem.

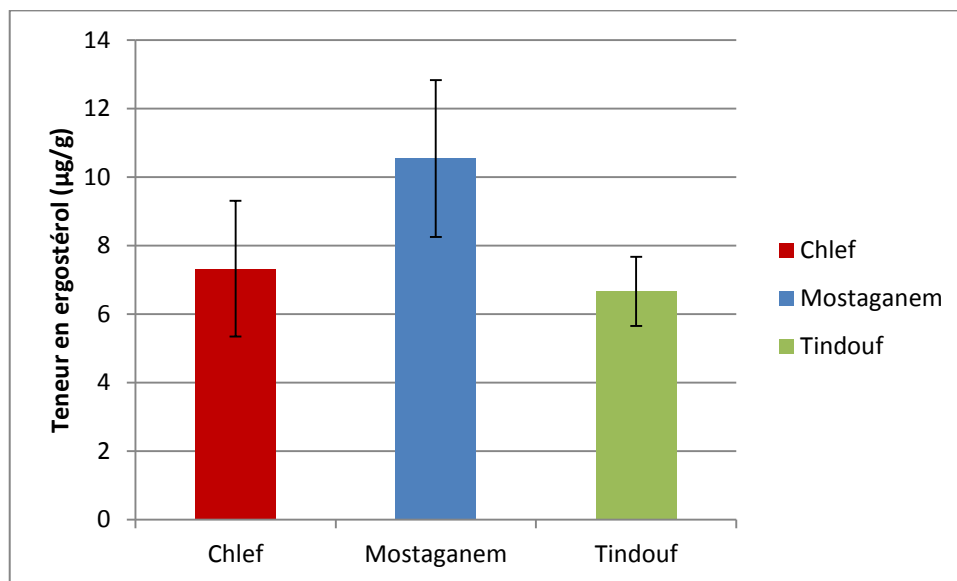


Figure 23 : Teneur en ergostérol dans les échantillons des sols rhizosphériques

Le dosage de l'ergostérol est utilisé pour l'analyse comparative de l'intensité de l'infection mycorhizienne non seulement dans différentes espèces végétales mais aussi dans des plantes co-spécifiques poussant dans des environnements différents, ce qui n'est pas moins important pour la recherche écologique. L'utilisation de l'ergostérol comme biomarqueur de la biomasse fongique est très prometteuse pour l'évaluation comparative de la mycorhisation dans les systèmes racinaires des plantes. Ainsi, la quantification de l'ergostérol dans les fines racines des plantes peut être un outil efficace pour estimer la quantité de biomasse fongique associée aux racines Buzin et *al.* (2016).

Selon l'étude conduite par Buzin et *al.* (2016), les concentrations d'ergostérol dans les rhizosphères des plantes variaient entre 0,9 µg/g chez le *Carex bigelowii* (espèce non mycorhizienne) à 39,2 µg/g chez *Betula nana* (espèce mycorhizienne). Ainsi, des différences de teneur en ergostérol ont été relevées non seulement entre les racines des plantes non mycorhiziennes et mycorhiziennes mais aussi entre les racines avec différents types de mycorhizes.

Certains auteurs, signalent que la quantité d'ergostérol était négativement corrélée à la salinité du sol, indiquant ainsi que les biomasses fongiques ectomycorhiziennes et saprotrophes étaient réduites avec la salinité (Benchrifa et *al.*, 2015).

3.4. Identification moléculaire des CMA

L'identification et la classification des CMA sont essentiellement basées sur les caractéristiques morphologiques des spores isolées à partir du sol. Malheureusement, les spores sont des structures relativement simples qui n'offrent qu'un nombre limité de caractéristiques discriminantes potentielles Redecker et *al.* (2000). En effet, dans le présent travail, sur les 16 espèces que nous avons pu isoler, 05 espèces n'ont été pas identifiées. Plusieurs études ont montré l'efficacité et la précision de l'analyse moléculaire dans l'identification des CMA, et ont même proposé plusieurs révisions de la taxonomie des CMA (Schüßler et *al.*, 2001, Schüßler et *al.*, 2001, Walker and Schüßler, 2010, Oehl et *al.*, 2011, Goto et *al.* 2012). C'est dans ce contexte que nous avons procédé à une identification moléculaire des dix espèces les plus abondants dans nos résultats en se basant sur le séquençage du fragment d'ADNr SSU.

Après l'extraction de l'ADN par le kit DNeasy Plant (Qiagen), l'amplification en utilisant les amorces NS31 et AML2, a généré un fragment SSU d'environ 550pb avec l'ensemble des espèces analysées (figure 24).

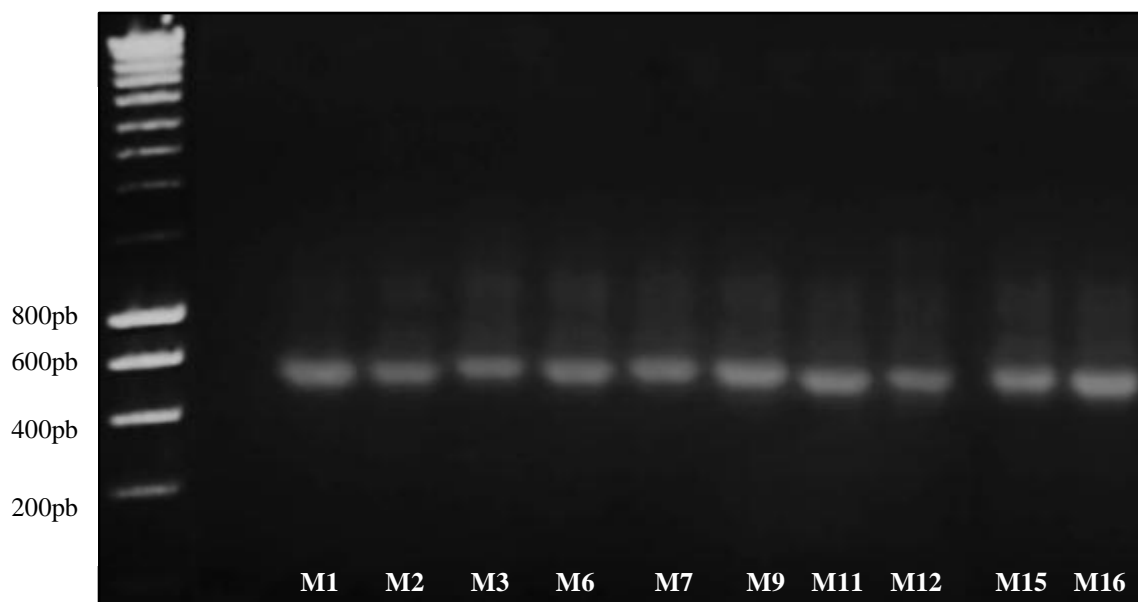


Figure 24 : Electrophorèse des produits de la PCR (NS31-AML1) des dix espèces les plus rencontrés (M : Morphotype).

La comparaison des séquences SSU obtenues avec les séquences disponibles sur la base de données GenBank (NCBI) par Blast nous a permis de confirmer l'identification morphologique de 7 morphotypes (01, 02, 03, 04, 07,12,). De plus le Blast nous a permis d'identifier les morphotype 09 (*Glomus etunicatum*), 15 (*Scutellospora cerradensis*) et 16 (*Entrophospora infrequens*) avec des pourcentages de similarités de (97, 98 et 96% respectivement). En revanche le morphotype 11 identifié morphologiquement comme *Acaulospora tortuosa* n'a pas été confirmé par le Blast (Tableau 6).

Tableau 6 : Comparaison des séquences SSU obtenues avec les séquences de la base de données GenBank (NCBI)

Morphotype	Identification morphologique	Identification moléculaire (Blast du SSU)	% de similitude
01	<i>Glomus constrictum</i>	<i>Glomus constrictum</i>	100%
02	<i>Glomus mosseae</i>	<i>Glomus mosseae</i>	99%
03	<i>Glomus clarum</i>	<i>Glomus clarum</i>	100%
06	<i>Glomus intraradices</i>	<i>Glomus intraradices</i>	98%
07	<i>Glomus proliferum</i>	<i>Glomus proliferum</i>	96%
09	<i>Glomus sp1</i>	<i>Glomus etunicatum</i>	97%
11	<i>Acaulospora tortuosa</i>	<i>Acaulospora sp</i>	98%
12	<i>Acaulospora denticulata</i>	<i>Acaulospora denticulata</i>	99%
15	<i>Scutellospora sp</i>	<i>Scutellospora cerradensis</i>	98%
16	<i>Entrophosporasp</i>	<i>Entrophospora infrequens</i>	96%

La construction de l'arbre phylogénétique par le logiciel MEGA a permis de confirmer les comparaisons faites par le Blast. En effet chaque morphotype a été regroupé avec ou proche de son homologue (figure 25).

L'arbre phylogénétique a confirmé l'identité du morphotype 09 (identifié morphologiquement comme étant *Glomus sp1* obtenu par Blast comme étant *Glomus etunicatum*). De plus, le morphotype 11 (*Acaulospora tortuosa*) non identifié par Blast a été classé selon l'arbre phylogénétique proche d'*Acaulospora entreriana* avec un pourcentage de ressemblance de 94%.

Les résultats obtenus relèvent une large diversité des CMA colonisant les racines d'arganier quelle que soit l'origine géographique. En effet les espèces isolées

appartiennent à 05 genres avec une nette dominance du genre *Glomus* suivi d'*Acaulospora*.

D'après les résultats de nos recherches bibliographiques, la présente étude constitue la première du genre à avoir utilisé l'identification moléculaire sur les champignons associés à l'arganier en Algérie et au Maroc. Il existe cependant des travaux similaires qui ont été menés sur d'autres espèces. A titre d'exemple, Abbas (2014) a mis en évidence grâce aux techniques moléculaires la dominance du genre *Glomus* dans la rhizosphère du *Tetraclinis articulata* poussant au Maroc en utilisant les amorces LSU. L'amplification et le séquençage des régions SSU et LSU ont permis aussi à Derkaoui (2018) de mettre en évidence la grande diversité des CMA associés à *Acacia saligna* poussant dans la dune de Terga sur le littoral Ouest algérien avec une nette dominance du genre *Glomus*.

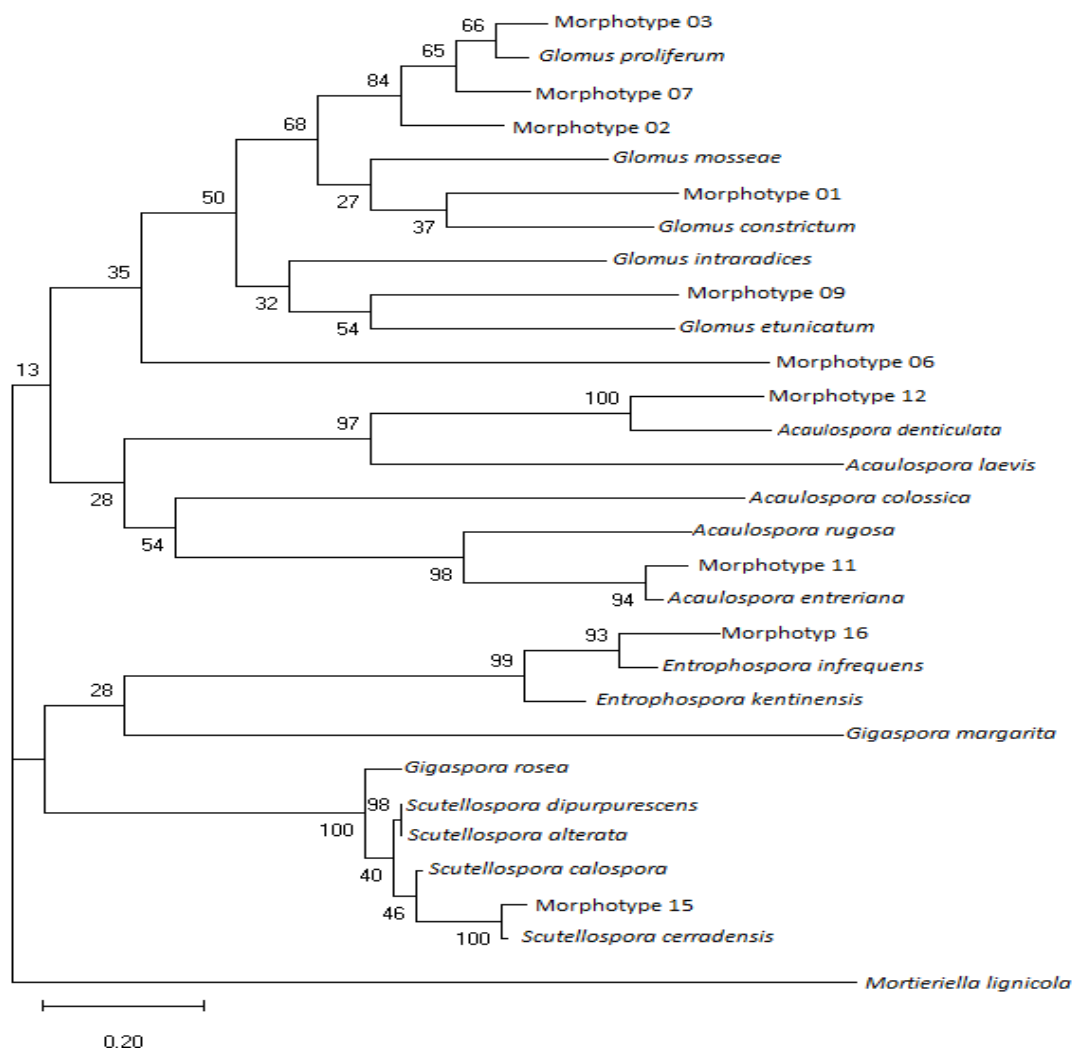


Figure 25 : Arbre phylogénétique et maximum de vraisemblance des CMA identifiés et quelques souches de référence.

Ces résultats confirment ceux d'Abbott et Robson (1991) et Mbogne (2015) qui ont montré que le genre *Glomus* est les plus abondants dans les régions tropicales. D'autre part plusieurs études ont révélé l'abondance des espèces appartenant au genre *Glomus* dans les écosystèmes méditerranéens aride et peuvent supporter la salinité des sols (Sanchez-Castro et *al.*, 2012 ;Ndoye et *al.*, 2012; Bencherif et *al.*, 2015).

3. Caractérisation des endophytes racinaires

Après culture et purification, nous avons pu isoler 04 espèces fongiques à partir des racines d'arganier. Les isolats examinés semblent appartenir à deux grands genres : *Aspergillus* et *Penicillium*. *Aspergillus* est représenté par trois espèces différentes (*A. sydowii* ; *A. versicoloret A. ustus*) et *Penicillium* par une seule (*P. citrinum*).

4.1. Caractérisation Morphologique des isolats

L'identification macroscopique et microscopique est basée sur l'aspect des colonies fongiques sur les milieux CREA, MEA, CYA 30, CYA 25, et sur la clé d'identification des espèces d'*Aspergillus* menée par Maren (2002) et une autre clé mise par Samson et *al.*(2010)

4.1.1. Isolat 1 : *Aspergillus sydowii*

Sur le milieu MEA, cet isolat est caractérisé par des colonies de 25cm de diamètre, de couleur bleue grise au centre et blanche au périphérique (figure 26, A2). Cette espèce pousse difficilement sur le milieu CREA (figure 26 A1).

En utilisant le milieu CYA à 30°C, cet isolat est caractérisé par des colonies de 21cm de diamètre de vertes au centre et blanches au périphérique et la présence des exsudats dorés (figure 26 A4). Les colonies prennent la couleur grise bleue au centre avec un périphérique grisclair et un diamètre de 18cm en plus des exsudats clair à 25°C (figure 26, A3).

Sous microscope, l'isolat est caractérisé par des vésicules presque sphérique sphériques ou presque, et des cellules conidiogènes bisériées - ayant des phialides qui proviennent de métules (figure 26 B).

Selon les caractères macroscopiques et microscopiques montrés dans la figure 26, et selon la clé d'identification des champignons, l'isolat 01 pourrait être *Aspergillus sydowii*.

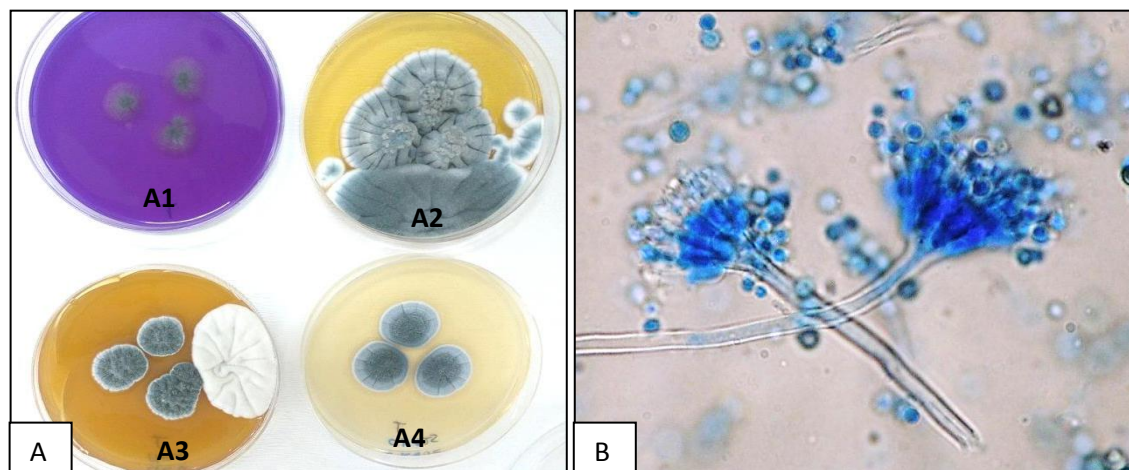


Figure 264 : Isolat 01 :*Aspergillus Sydowii*, A : aspect macroscopique ; A1 : Milieu CREA ; A2 : Milieu MEA ; A3 : Milieu CYA 30 ; A4 : Milieu CYA 25 ; B : Aspect Microscopique X100.

4.1.2. Isolot 2 : *Aspergillus versicolor*

Sur le milieu MEA, cet isolat est caractérisé par des colonies de 17cm de diamètre, de couleur grise au centre et blanche au périphérique et la présence des exsudats brunes (figure 27 , A2). Par contre elle pousse difficilement sur le milieu CREA (figure 27, A1)

Sur le milieu CYA à 30°C, cet isolat est caractérisé par des colonies de 28cm de diamètre de couleur blanche à beige et la présence des exsudats jaunes-dorés (figure 27 A4). Les colonies prennent la couleur blanche au centre et aux périphériques et vert grise entre les deux et un diamètre de 18cm en gardant la même couleur des exsudats à 25°C (figure 27, A3).

Sous microscope, les vésicules apparaissent allongées, d'aspect spatulé, les phialides portées par des métules et couvrant les trois quarts supérieurs de la vésicule (figure 27 B). Selon les caractères macroscopiques et microscopiques montrés dans la figure 27 et selon la clé d'identification des champignons, l'isolat 02 pourrait être *Aspergillus versicolor*.

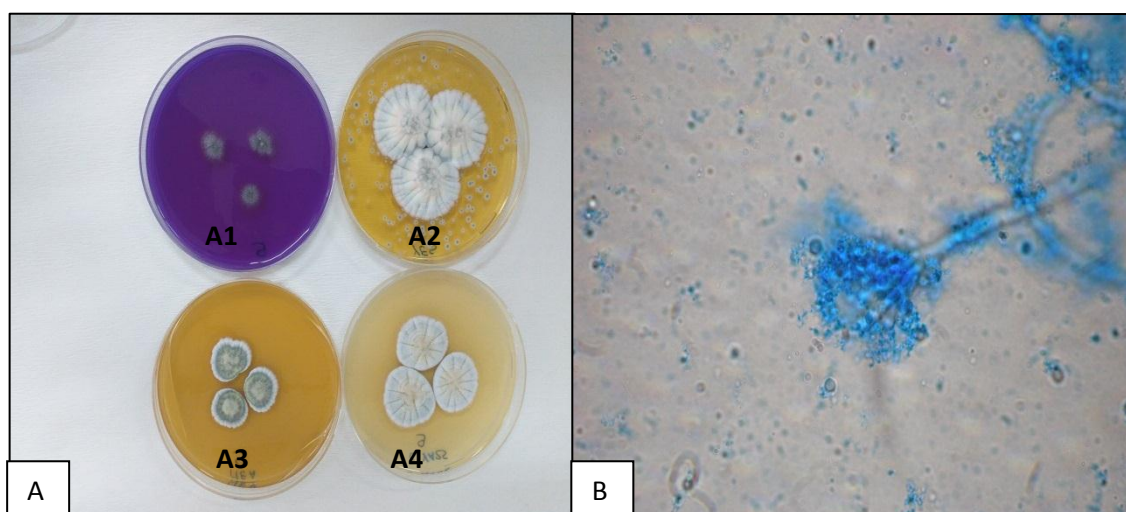


Figure 27 : Isolât 2 : *Aspergillus versicolor* A : aspect macroscopique ; A1 : Milieu CREA ; A2 : Milieu MEA ; A3 : Milieu CYA 30 ; A4 : Milieu CYA 25 ; B : Aspect Microscopique X100.

4.1.3. Isolât 3 : *Aspergillus ustus*

La principale différence entre cet isolât et les précédents c'est son aptitude à croître sur le milieu CREA en formant des colonies de 24cm de taille moyenne et sont de couleur grise avec un périphérique blanc et des exsudats claires (figure 28 A1).

Sur milieu MEA, les colonies sont de taille moyenne de 40cm et de couleur mauve-claire avec un périphérique blanc (figure 28 A2).

Sur le milieu CYA à 30°C, la couleur des colonies (26cm de diamètre) devient marron-foncée au centre avec un périphérique blanc et la présence des exsudats blancs. Sur le même milieu à 25°C, la couleur des colonies devient grise-foncée au centre et blanche grise au périphérique avec une taille de 32cm.

Au microscope, cet isolât est caractérisé par des vésicules sphériques et des conidies rugueuses et sphériques (figure 28 B)

Selon les caractères macroscopiques et microscopiques montrés dans la figure 28, et selon la clé d'identification des champignons, l'isolât 03 serait *Aspergillus ustus*.

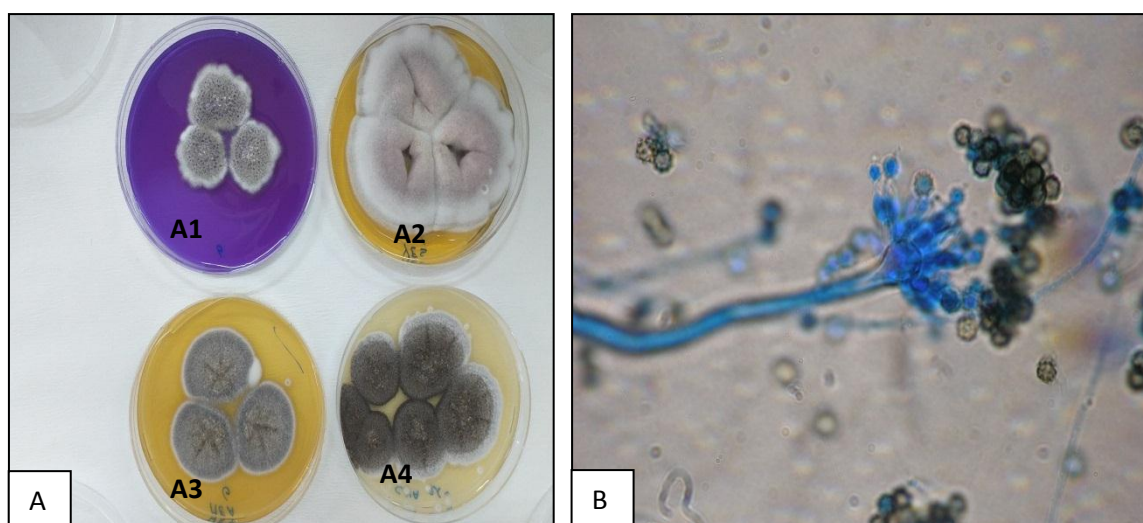


Figure 28 : Isolot 2 : *Aspergillus ustus* A : aspect macroscopique ; A1 : Milieu CREA ; A2 : Milieu MEA ; A3 : Milieu CYA 30 ; A4 : Milieu CYA 25 ; B : Aspect Microscopique X100.

4.1.4. Isolot 4 : *Penicillium citrinum*

Cette espèce est caractérisée par des colonies blanches au centre et un périphérique vert mosaïque de 29 cm de diamètre et la présence des exsudats de couleur jaune.

Sur le milieu CYA les colonies prennent la couleur verte à verte bleue au centre avec un périphérique blanc mosaïque avec un diamètre de 22 à 23 cm.

Au microscope, les conidiophores sont biverticillés, les métules se trouvent dans des verticilles de 3 à 5 structures divergentes. Les phialides sont ampuliformes (en forme de flacon). Les sont globuleuses à sous-globuleuses (figure 29 B).

Selon les caractères macroscopiques et microscopiques et la clé d'identification des champignons, l'isolot 04 appartient serait *Penicillium citrinum*.

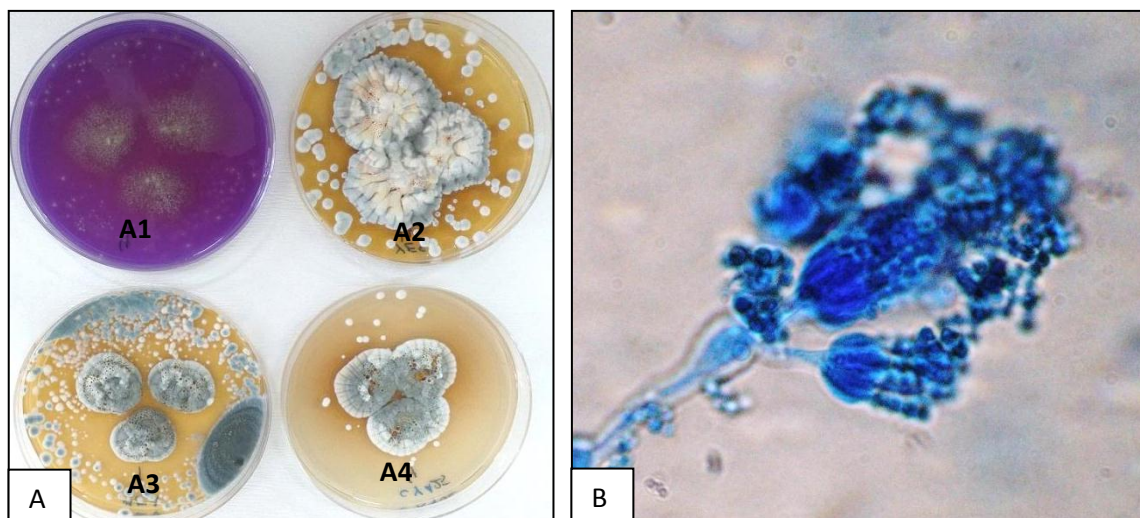


Figure 29: Isolat 02 *Penicillium citrinum*, A : aspect macroscopique ; A1 : Milieu CREA ; A2 : Milieu MEA ; A3 : Milieu CYA 30 ; A4 : Milieu CYA 25 ; B : Aspect Microscopique X100.

Les quatre isolats ont été décelés dans l'ensemble des échantillons prélevés de Mostaganem et de Chlef. En revanche, dans les échantillons de Tindouf, seuls les isolats 1 et 3 ont été dépistés et aucune trace pour les isolats 2 et 4.

La rhizosphère est l'habitat naturel pour des myriades de microorganismes et d'autres formes vivantes, formant des populations de différents genres. Le nombre et l'activité de ces populations changent d'une région à une autre, influencé par le contenu de matières organiques du sol, la texture du sol, le pH, l'humidité, la température, l'aération et d'autres facteurs (Ruark et Zarnoch, 1992 ; Madigan et *al.*, 1997 ; Subler et Kirsch, 1998 ; Peuk, 2000 ; Smith et *al.*, 2000).

4.2. Caractérisation moléculaire des isolats

L'amplification de l'ADNr en utilisant les amorces ITS1F-ITS4 a permis d'obtenir des fragments de 550-600pb (figure 30). Aussi, les résultats du séquençage de l'ADNr nous ont permis de confirmer l'identification des 04 isolats avec des pourcentages de similitudes de 99 à 100 % (tableau 7).

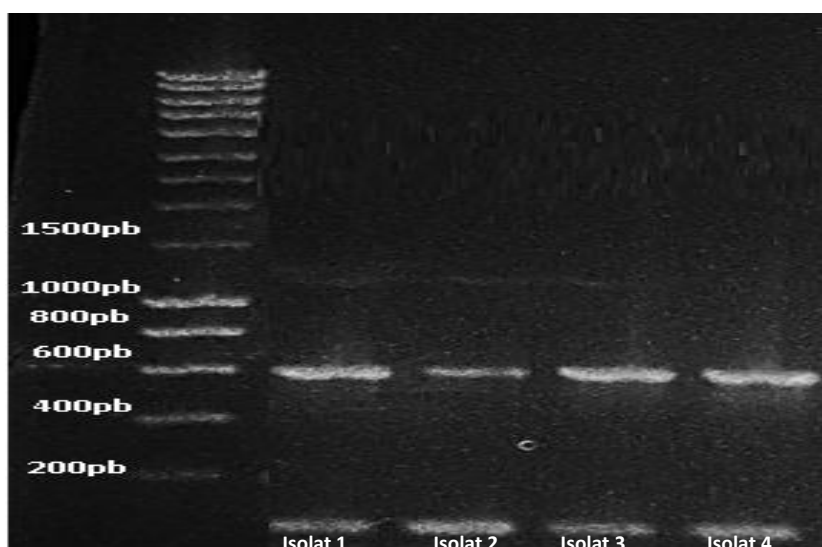


Figure 30 : Electrophorèse des produits de la PCR (ITS1F-ITS4) des quatre isolats

Tableau 7 : Comparaison des séquences ITS obtenues avec les séquences de la base de données GenBank (NCBI)

Isolat	Identification morphologique	Identification moléculaire (Blast des ITS)	% de similitude
01	<i>Aspergillus sydowii</i>	<i>Aspergillus sydowii</i>	99%
02	<i>Aspergillus versicolor</i>	<i>Aspergillus versicolor</i>	100%
03	<i>Aspergillus ustus</i>	<i>Aspergillus ustus</i>	100%
06	<i>Penicillium citrinum</i>	<i>Penicillium citrinum</i>	99%

La construction de l'arbre phylogénétique par le logiciel MEGA a permis de calculer les distances génétiques entre les isolats et les cultures pures ce qui a réaffirmé l'identité des espèces isolées (figure 31).

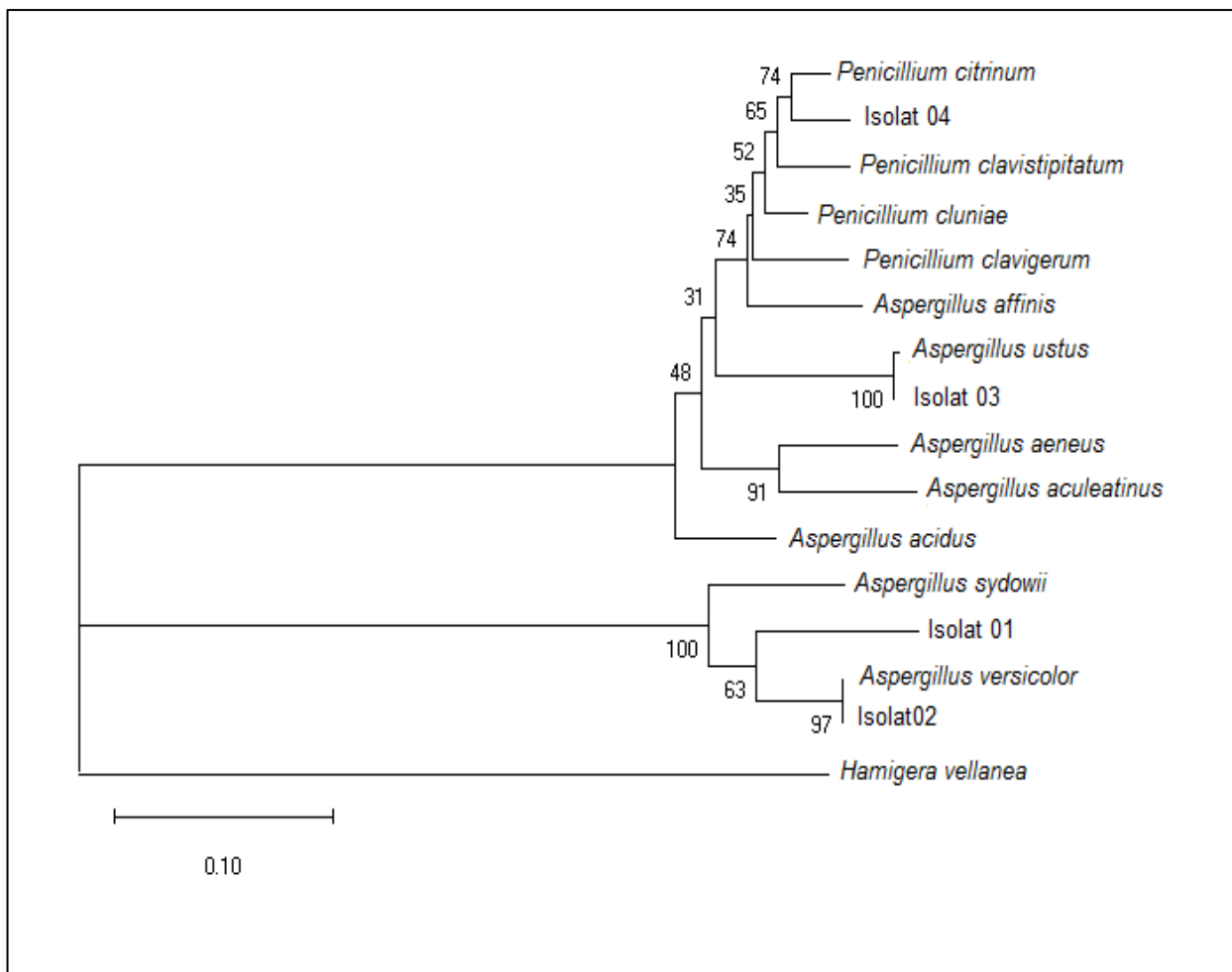


Figure 31 : Arbre phylogénétique et maximum de vraisemblance des isolats endo-racinaires identifiés et quelques souches de référence

Les genres *Penicillium* et *Aspergillus* regroupent à eux seuls plusieurs centaines d'espèces. Ce sont de saprophytes très répandus dans l'environnement, à l'origine de la dégradation de denrées alimentaires. Ils sont aussi très utilisés dans l'industrie, notamment dans l'industrie agro-alimentaire et pharmaceutique. Certaines espèces peuvent en outre produire de dangereuses mycotoxines (Botton *et al.*, 1990).

Les espèces endophytes d'*Aspergillus* ont prouvé leur capacité à produire de nombreux métabolites secondaires actifs, tels que les buténolides, les alcaloïdes, les terpénoïdes, les cytochalasines, les phénalénones, les terphényles, les xanthonnes, les stérols, les diphényléther et les dérivés d'antraquinones qui ont de grande importance dans les industries pharmaceutiques et commerciales. Les métabolites produits par différentes espèces endophytes d'*Aspergillus* ont montré diverses activités biologiques,

telles que des activités anti-inflammatoires, anticancéreuses, antibactériennes et antivirales (El-hawary et al., 2020).

Aspergillus sydowii est un champignon saprotrophique commun présent dans les sols rhizosphériques (Rypien et Andras 2008). Récemment, Singh et al. (2020) l'ont isolé à partir des racines d'*Argemone mexicana*. D'autre part, Baron et al. (2018) suggèrent l'utilisation d'*A. Sydowii* pour améliorer l'efficacité de l'absorption du phosphore chez le maïs.

Aspergillus versicolor est un champignon commun du sol (Stein et Bulboacă, 2017). Il a été isolé à partir du rhizome de *Paris polyphylla* (Gao et al., 2018) et des feuilles de *Centella asiatica* (Netala et al., 2016) et d'*Eichhornia crassipes* (Ebada et al., 2018). L'espèce est connue pour produire un large éventail de métabolites structurellement diversifiés, notamment les isocoumarines, les xanthones, les sesquiterpénoïdes, les butyrolactones, et les anthraquinones. Tous ces métabolites secondaires sont connus pour leurs activités biologiques (ElAgamy et al., 2019; Ebada et al., 2018).

Aspergillus ustus est un champignon endophyte qui a été isolé à partir de racines de *Boutelouae riopoda* et d'*Atriplex canescens* par Lucero et al. (2006). Barrow et Osuna (2002) ont décrit que ce champignon aide à l'absorption du phosphore chez *Amorpha canescens* et qu'il peut se propager par mode végétatif ou sexué dans le sol. En cultivant des plants de pommes de terre dans des cultures aseptiques, Marina et al. (2011) ont isolé et identifié par séquençage ITS l'espèce *A. ustus*, qui favorise la croissance des plants de pommes de terre et d'*Arabidopsis*.

Penicillium citrinum est un champignon endophyte isolé de tissus végétaux, vivant dans des tourbières tropicales. Diverses études révèlent que les champignons endophytes présentent des avantages pour la santé des plantes. Depuis 2015, des séries d'expériences (comme le test de pathogénicité, test *in vitro*, application directe sur les semences, test de dosage et formulation d'engrais) ont été menées pour étudier la capacité de *P. citrinum* en tant que biofertilisant d'arbre végétal au stade de la pépinière (Safinah et al., 2019).

5. Analyse métagénomique de la communauté fongique endoracinaire

5.1. Effet de la dilution de l'extrait sur le succès de la PCR

D'après la figure 32, on constate que la dilution de l'extrait d'ADN peut affecter fortement le succès de la PCR. En fait, sur les 15 échantillons analysés, seuls 6 ont été amplifiés dans des extraits dilués au 1:1 et 11 dans à les extraits dilués au 1:10. Cependant, dans les dilutions 1:20 et 100, tous les échantillons ont été amplifiés avec une qualité d'amplification plus élevée pour les échantillons dilués 1:20. Ce résultat peut être dû à la dilution des inhibiteurs de la PCR, ce qui influence positivement l'amplification de l'ADN. Les inhibiteurs sont des interférences matricielles chimiques et biologiques (polyphénols, polysaccharides, etc.) qui coextraient avec l'ADN et affectent le traitement en aval (Schrader et *al.*, 2012). Ces substances interférentes présentent un défi pour l'identification des espèces en raison des effets inhibiteurs sur l'amplification de la courte répétition en tandem (STR) (Funes-Huacca et *al.*, 2011). L'effet inhibiteur de ces molécules peut être réduit par dilution de l'extrait d'ADN. Cependant, une dilution excessive est également inquiétante, ce qui suggère que les échantillons d'ADN du sol et des racines devraient être dilués de manière adéquate sous la forme d'un surdosage (entraînant une sous-estimation du nombre de copies de gènes) (Wang et *al.*, 2017).

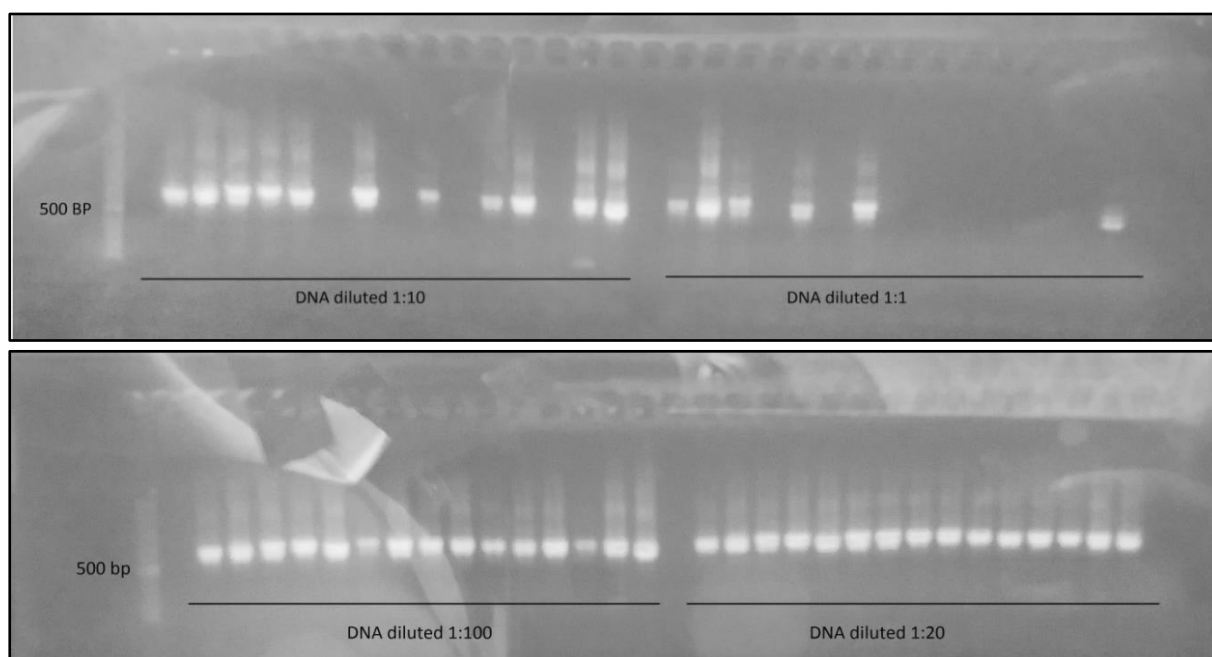


Figure 32 : Electrophorèse des produits de la PCR (ITS1F-ITS4) de l'ADN fongique extrait des racines (effet de la dilution de l'ADN)

5.2. Résultats de l'analyse métagénomique des communautés fongiques

En utilisant un séquençage à haut débit, nous avons exploré les communautés fongiques dans les trois régions. La majorité des unités taxonomiques opérationnelles (OTU) fongiques qui ont été mises en évidence appartenaient au phylum *Ascomycota* et *Basidiomycota*.

La communauté fongique était très diverse. En effet 1220 OTU fongiques, y compris des singletons, ont été enregistrées. Après suppression des singletons de notre analyse, 586 OTU appartenant à 65 genres différents ont été obtenues. Les dix genres les plus fréquents appartenaient aux trois groupes : les endophytes, les pathogènes et champignons ectomycorrhiziens (Figure 33). Il est à signaler que les CMA ont été détectés en singletons.

Ces résultats concordent avec ceux de l'isolement et l'identification des champignons à partir des racines. En effet, l'analyse métagénomique a permis de détecter les genres *Aspergillus* et *Penicillium* dans les racines d'arganier (Figure 33).

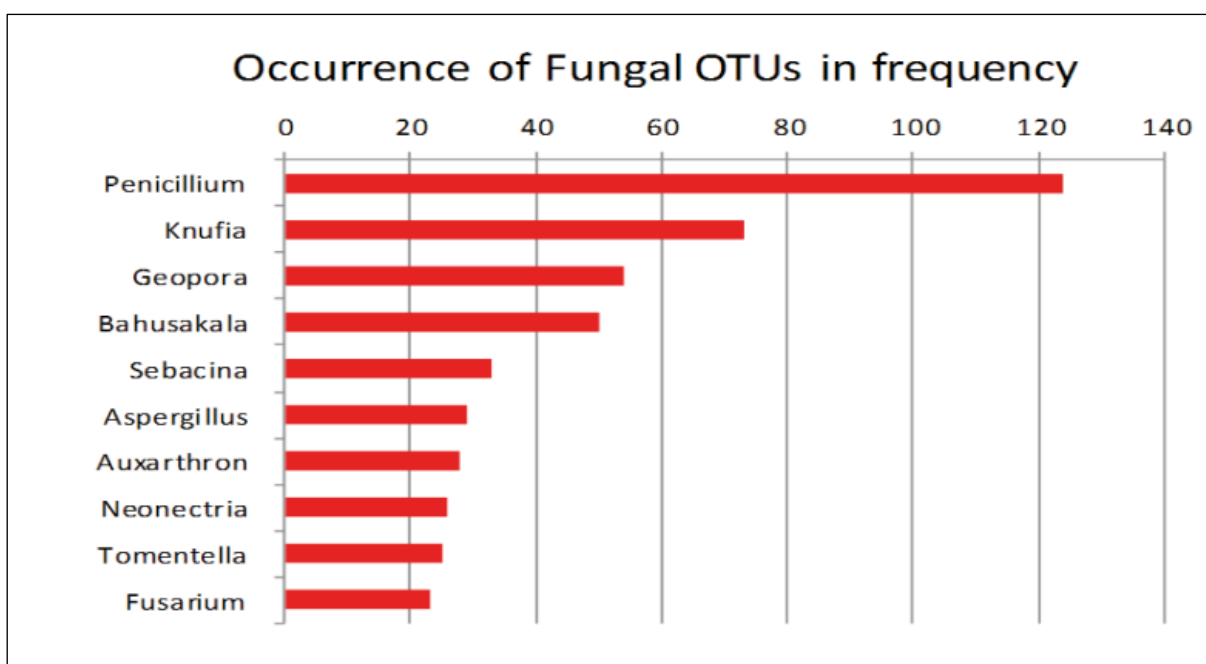


Figure 33 : Fréquence relative des différents genres fongiques.

Les genres *Geopora*, *Sebacina*, *Knufia*, *Tomentella* et *Penicillim* avaient une abondance relative élevée dans termes d'abondance de séquences lues (figure 33).

Le phylum *d'Ascomycota* était le plus abondant de toutes les régions (461 lectures) comparées à *Basidiomycota* (125 lectures).

Le nombre de lectures des OTU varie entre les trois régions et d'un échantillon à l'autre dans la même région. En fait, Mostaganem était la région la plus riche en communauté fongique. Le genre *Neonectria* était absent dans tous les échantillons de la région de Mostaganem (Figure 34). Par contre, *Sebacina* était le genre le plus abondant à Tindouf suivi du genre *Geopora* en deuxième position. Le genre *Sebacina* était absent dans tous les échantillons de Mostaganem. Cependant, les champignons non identifiés étaient les plus importants dans la région de Chlef et de Mostaganem ($p = 0,001$).

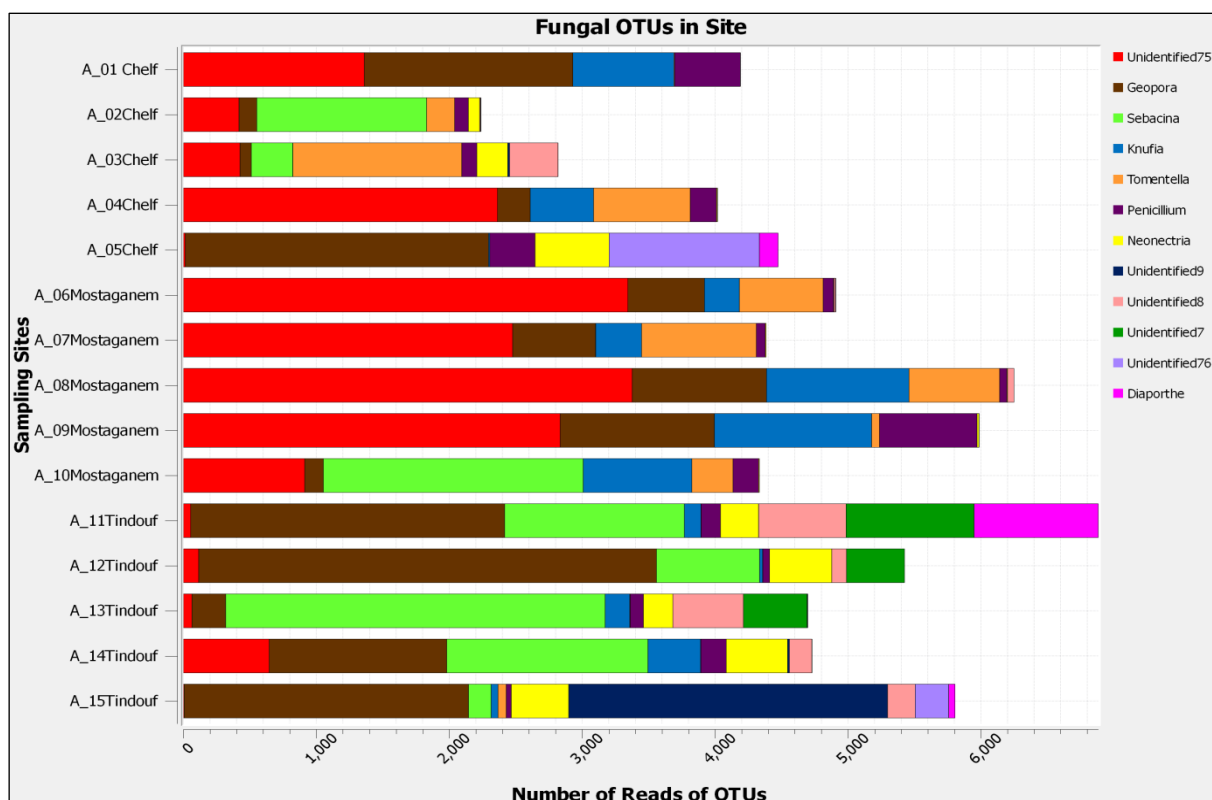


Figure 34 : Abondance relative des genres fongiques

La courbe basée sur l'échantillon a capturé la diversité maximale pour les OTU fongiques communs et la raréfaction, a révélé une augmentation de la richesse en OTU, alors que nous n'avons pas obtenu de courbe plateau pour les taxons fongiques rares que ce soit en présence ou en absence des singletons, ce qui confirme que la suppression des OTU singletons n'avait pas une influence sur l'analyse de la communauté fongique endoracinaire (Figure 35).

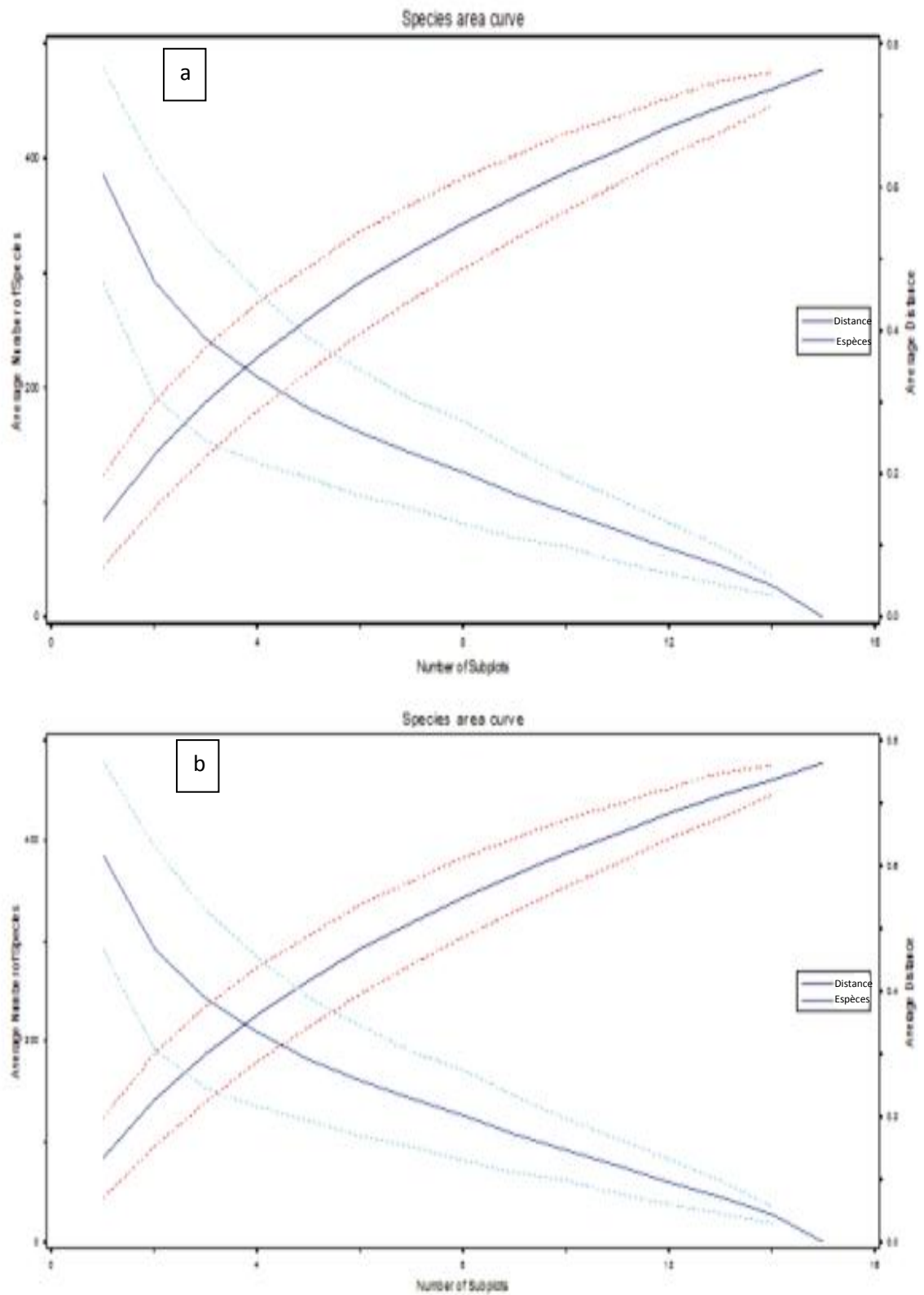


Figure 35 : Courbe de raréfaction pour toutes les OTU fongiques. Axe X = nombre de sous-graphiques et axe Y = OTU et distance des OTU (a : sans singletons, b : avec singletons).

Nous avons détecté un faible niveau d'imbrication tel que révélé par l'analyse. Les valeurs NODF pour l'ensemble de la communauté fongique n'étaient pas significativement plus élevées que prévu par hasard (NODF = 16, $p = 0,7$). 19 espèces représentaient une association non aléatoire significative et la majorité des espèces présentaient un schéma de ségrégation, tandis que 5 espèces révélaient une concurrence positive (tableau 8).

Tableau 8 : Résultats des paires d'espèces basés sur les valeurs Z et P

Espèce 1	Espèce 2	Z -score	P-value
<i>Phomopsis</i> sp.	<i>Tricholoma</i> sp.	4.9	6×10^{-7}
<i>Tricholoma</i> sp.	<i>Pseudogymnoascus</i> sp.	4.9	6×10^{-7}
<i>Knufia</i> sp.4	<i>Phomopsis</i> sp.	4.6	3.5×10^{-6}
<i>Tomentella</i> sp.	<i>Phomopsis</i> sp.	4.5	4.2×10^{-6}
<i>Pseudogymnoascus</i> sp	<i>Bahusakala</i> sp.2	4.4	8.7×10^{-6}
<i>Knufia</i> sp.4	<i>Pseudogymnoascus</i> sp.	3.7	1.4×10^{-4}
<i>Knufia</i> sp.4	<i>Diaporthe</i> sp.	3.7	2.0×10^{-4}
<i>Knufia</i> sp.3	<i>Phomopsis</i> sp.	3.3	8.8×10^{-4}
<i>Tomentella</i> sp.	<i>Pseudogymnoascus</i> sp.	3.1	1.6×10^{-3}
<i>Tricholoma</i> sp.	<i>Embellisia</i> sp.	3.1	1.7×10^{-3}
<i>Pyrenochaeta</i> sp.	<i>Penicillium</i> sp.6	2.9	3.2×10^{-3}
<i>Tricholoma</i> sp.	<i>Diaporthe</i> sp.	2.8	3.8×10^{-3}
<i>Knufia</i> sp.3	<i>Diaporthe</i> sp.	2.8	4.8×10^{-3}
<i>Knufia</i> sp.3	<i>Embellisia</i> sp.	2.7	5.9×10^{-3}
<i>Phomopsis</i> sp.	<i>Pseudogymnoascus</i> sp.	-1.9	4.7×10^{-2}
<i>Knufia</i> sp.3	<i>Knufia</i> sp.4	-2.0	4.4×10^{-2}
<i>Tricholoma</i> sp.	<i>Bahusakala</i> sp.2	-2.1	3.04×10^{-2}
<i>Knufia</i> sp.4	<i>Tricholoma</i> sp.	-2.2	2.7×10^{-2}
<i>Knufia</i> sp.1	<i>Paraphoma</i> sp.	-2.6	8.5×10^{-3}

Les interactions compétitives étaient prédominantes au niveau du phylum et du sous-phylum. Des interactions positives entre les champignons du même genre et de genres différents ont été observées (tableau 8).

L'étude basée sur la culture fongique a révélé la prédominance des champignons *Ascomycota* dans le désert couvert par *Artemisia herba-alba* Asso et *Zygophyllum dumosum* Boiss (Grishkan et Nevo, 2010).

Les résultats actuels corroborent avec ceux rapportés par l'étude menée dans les zones semi-arides, et basée sur un séquençage à haut débit, qui a mis en évidence l'abondance du phylum *Ascomycota* en semi-aride (Wehner et al., 2014). Nos résultats soutiennent l'idée que l'arganier héberge diverses communautés fongiques. Nous avons signalé des OTU fongiques représentant une diversité fonctionnelle différente comme les mycorhizes, les endophytes et les pathogènes. Il n'est pas rare de signaler et de documenter une telle diversité fonctionnelle dans un habitat semi-aride. Il a été bien démontré la présence d'une diversité mycorhizienne, endophyte et pathogène dans les zones semi-arides (Porrás-Alfaro et al., 2008). Nous avons mis en évidence la dominance du phylum d'*Ascomycota* et des OTU fongiques tels que *Penicillium* et *Fusarium*. En effet, les semi-arides supportent une diversité fongique endophyte élevée, car de fortes preuves suggèrent que la prévalence et la dominance des *Ascomycota*, *Penicillium* et *Fusarium* (Gonzalez-Teuber et al., 2017).

Les OTU du genre *Geopora* qui sont identifiées et caractérisées dans la recherche actuelle, pourraient être comparées à d'autres habitats. En effet, des auteurs comme Flores-Renteria et al. (2014) ont révélé que *Geopora* forme une association mycorhizienne avec les espèces de *Pinus*. Les échantillons prélevés en saison sèche et analysés ont révélé la dominance des champignons du genre *Geopora* (Gordon et Gehring, 2011). Cela montre l'adaptabilité et l'occurrence de *Geopora* dans diverses conditions environnementales. L'arganier soutient une grande diversité fongique, car les espèces de *Basidiomycota* ont également été enregistrées. Habituellement, les champignons basidiomycètes se trouvent dans un habitat relativement humide (Buee et al., 2009). Par conséquent, la diversité fongique explorée pourrait être liée à d'autres paramètres. Des recherches menées dans la forêt tempérée secondaire ont signalés la

présence de champignons endophytes et ectomycorhiziens chez une seule espèce de plante hôte (Frossard et *al.*, 2015).

Le genre *Sebacina* faisait partie des genres fongiques abondants détectés dans les échantillons de racines d'arganier de Tindouf. Il existe des preuves solides qui soutiennent la nature omniprésente des *Sebacinales* et de telles preuves émergentes indiquent une présence omniprésente de champignons dans divers habitats. Nos résultats n'ont pas capturé la diversité fongique rare (figure 35b). L'explication plausible de l'absence de diversité fongique rare est la surexploitation des espèces d'arganiers et la surexploitation peut endiguer l'extinction locale de taxons fongiques rares.

La communauté fongique a représenté un assemblage non imbriqué et au contraire les champignons ont révélé des interactions compétitives (tableau 9). Les découvertes actuelles non imbriquées confirment également que les champignons ont un modèle similaire à celui des champignons dans les forêts. Nous avons trouvé un soutien pour notre hypothèse selon laquelle les champignons peuvent manquer de motif imbriqué et cela pourrait également conduire à la conclusion que la racine d'arganier ne supporte pas les interactions de facilitation.

Des résultats similaires ont été signalés par d'autres auteurs (Bahram et *al.*, 2014; Roy-Bolduc et *al.*, 2016). Puisque l'arganier est soumis à la gestion humaine et à la pression du pâturage (Charrouf et Guillaume, 2009; Díaz-Barradas et *al.*, 2010), nous ne pouvons pas exclure les facteurs anthropiques provoquant un assemblage non emboîté de champignons.

Une autre explication est que les plantes hôtes étaient soumises à un stress abiotique, qui à son tour peut avoir généré un motif non imbriqué.

L'analyse par paires a reflété le modèle de ségrégation entre le même groupe fongique fonctionnel et un groupe différent. Plusieurs mécanismes sont proposés pour révéler de tels modèle d'occurrence et interactions concurrentielles entre les OTU fongiques pourraient générer un modèle de ségrégation (Chen et *al.*, 2000; Chilvers et *al.*, 1987).

Les interactions compétitives entre les OTU fongiques dans les zones semi-arides ont révélé que les communautés fongiques étaient structurées de manière non aléatoire dans

les zones semi-arides. Nos résultats sont en ligne avec (Wehner et *al.*, 2014) qui a mis en évidence l'abondance du phylum *Ascomycota* en semi-aride. Nous avons également montré que la majorité des OTU fongiques appartenant au phylum *Ascomycota* avaient des scores Z -2 supérieurs à 2 (tableau 9), ce qui montre une signification statistique (Ulrich, 2008). Les paires de champignons ayant un mode de vie endophyte et mycorhizien avaient des scores Z élevés, ce qui indiquait un signal fort de concurrence entre eux. Il est important de mentionner que les études précédentes se sont concentrées sur les groupes fongiques et ont mis en évidence la prévalence des modèles de ségrégation entre les champignons ectomycorhiziens et endophytes (Pickles et *al.*, 2012; Saunders et *al.*, 2010).

Des interactions positives entre des OTU fongiques identiques et différentes ont suggéré des interactions de facilitation entre les champignons. Les interactions de facilitation entre les champignons pourraient être dues au fait que des champignons ayant des exigences fonctionnelles similaires peuvent occuper le même habitat, ce qui à son tour pourrait entraîner des interactions de facilitation. Les espèces peuvent trier en fonction d'exigences communes (Leibold et *al.*, 2004), cela peut générer des interactions positives entre les espèces. Étant donné le fait, différents genres fonctionnels dans la racine se produisent en raison de différentes exigences écologiques et physiologiques; il existe désormais une forte probabilité d'interactions positives entre les champignons et les interactions de facilitation sont bien documentées entre les différents groupes de champignons fonctionnels (Wagg et *al.*, 2008).

Conclusion et perspectives

Conclusion et perspectives

Les résultats de cette étude nous ont permis de répondre à un bon nombre de questions que nous nous sommes posées au départ. Nous pouvons résumer l'essentiel de nos résultats comme suit :

S'agissant des caractéristiques physico-chimiques des sols, nous avons relevé qu'il existe des différences significatives entre les trois régions étudiées. Le sol de Mostaganem est le plus riche comparativement aux deux autres régions surtout en certains éléments minéraux comme le phosphore, l'azote, le carbone total et aussi en matière organique. En revanche, le sol rhizosphérique de Tindouf a enregistré les plus faibles teneurs en ces composés.

L'examen microscopique des racines de l'Arganier a montré que tous les échantillons observés sont densément colonisés par des champignons mycorhiziens arbusculaires et aussi par la présence de champignons endophytes. Le taux de mycorhization dans les racines a atteint les 98% à Tindouf, 95% à Chlef et n'a guère dépassé les 87% à Mostaganem.

En ce qui concerne les CMA, nous avons réussi à isoler et caractériser morphologiquement 16 espèces à partir des sols rhizosphériques. Ces espèces appartiennent à 5 genres différents (*Glomus*, *Acaulospora*, *Gigaspora*, *Scutellospora*, *Entrophospora*). Le genre *Glomus* est le plus abondant, suivi du genre *Acaulospora*.

Notons par ailleurs, que certaines espèces ont été dépistées uniquement dans une région donnée. C'est le cas des espèces *Glomus rubiformis* et *Gigaspora* à Mostaganem ou *Acaulospora delicata* à Tindouf.

Les résultats de la caractérisation biochimique (obtenus par analyse chromatographique) viennent confirmer, la présence de CMA dans les sols rhizosphériques des arbres d'arganier. En effet, les analyses ont permis de déceler des acides gras caractéristiques des CMA dans les sols des trois régions étudiées. Il s'agit notamment de l'acide palmitoléique (C16 :1 ω 5) présent à des teneurs allant de 15,34% à 17,51% et aussi de l'ergostérol.

Pour ce qui est des résultats de l'analyse moléculaire, effectuée grâce au séquençage de l'ADNr, ils ont permis de confirmer l'identité de dix morphotypes de CMA les plus abondants.

Au sujet des champignons endophytes isolés à partir de racines d'arganier, en tout 4 espèces ont été dépistées et caractérisées morphologiquement en se basant à la fois sur des observations microscopiques et aussi sur les aspects (couleur, diamètre, etc.) que prennent les colonies fongiques en les faisant pousser sur quatre milieux de cultures spécifiques. Les espèces isolées appartiennent aux genres *Aspergillus* et *Penicillium*, il s'agit de *A. sydowi*, *A. ustus*, *A. versicolor* et *P. cintrinum*.

Une fois de plus les résultats de l'analyse moléculaire sont venus confirmer l'identité des 04 isolats fongiques (*A. sydowi*, *A. ustus*, *A. versicolor* et *P. cintrinum*) avec des pourcentages de similitudes de 99 à 100 %.

Concernant, l'analyse métagénomique de la communauté fongique endoracinaire, elle nous a révélé que la majorité des OTU fongiques appartenaient au phylum *Ascomycota* (461 lectures) et à *Basidiomycota*(125 lectures).

La communauté fongique mise en évidence est très variée et comprend 586 OTU appartenant à 65 genres. Les dix genres les plus fréquents appartenaient à trois groupes : des endophytes, des pathogènes et des champignons ectomycorhiziens. Les genres *Geopora*, *Sebacina*, *Knufia*, *Tomentella* et *Penicillim* avaient une abondance relativement élevée en termes de séquences lues. Le phylum *Ascomycota* est très abondant et présent dans toutes les régions.

Malgré les résultats encourageants que nous avons pu obtenir lors de cette étude, il nous paraît important d'envisager d'autres travaux de recherche en perspective qui viendront compléter le présent travail. Les travaux en question doivent porter sur les points suivants :

- Poursuivre les études sur de la diversité des CMA et des endophytes racinaires associées à l'arganier et évaluer le rôle de la flore fongique sur la production, la conservation et la régénération de l'arganier.

- Réaliser le séquençage du génome entier des espèces fongiques isolées notamment les espèces non identifiées.
- Poursuivre les études sur l'isolement et l'identification d'autres espèces fongiques et bactériennes associés à la rhizosphère d'arganier.
- Evaluer les effets des espèces fongiques isolées sur la croissance et le développement de l'arganier ou d'autres espèces à intérêts socio-économiques.
- Etude sur les biomolécules actives synthétisées par les espèces d'*Aspergillus* et de *Penicillium* isolées.
- Etude sur la régénération *in vitro* de l'arganier par l'utilisation de plants mycorhizés en pépinière.

Références bibliographiques

Abbas Y. 2014. Microorganismes de la rhizosphère des Tétracélinées : un outil pour optimiser la régénération assistée du *Tetraclinis articulata*. Thèse de doctorat. Université Mohammed V.Rabat, 157p.

Abbas, Y., Bakkali, Y. S., Prin, Y., Arahou, M., Abourouh, M., and Duponnois, R. 2013. Growth and nutrition of *Tetraclinis articulata* (Vahl) Mast.cultivated in different rhizosphere soils collected from *Tetraclinis* stand. *Biotechnology, Agronomy, Society and Environment*, 17, 3-11

Abbott, L. 1982. Comparative anatomy of vesicular-arbuscular mycorrhizas formed on subterranean clover. *Australian Journal of Botany*. 30:485–499

Abbott, L.K. and Robson, A.D. 1991 Factors influencing the occurrence of vesicular-arbuscular mycorrhizas. *J Agric Ecosyst Environ*. 35:121–150

Abdel Latef, A. A. H., Hashem, A., Rasool, S., Abd_Allah, E. F., Alqarawi A.A, Egamberdieva, D., Jan, S., Anjum, N. A., Ahmad, P. 2016. Arbuscular mycorrhizal symbiosis and abiotic stress in plants: A Review. *J Plant Biol*. 59(5): 407-426.

Adlouni,A. 2010. L'huile d'argan, de la nutrition á la sante, article de synthèse. *Nutrition*. 8 : 89-97

Aibeche, C. et Fartas, Z. 2011. Les endomycorhises arbusculaires de l'arganier (*Argania spinosa* L. Skeels) du nord-ouest Algérien. Le premierséminaire international d'étude : Agriculture biologique et développement durable(AGRIBIO 2011). Oran, 12-15 Février 2011.

Alifriqui, M., 2004. L'écosystème de l'arganier. Pnud. 124 p

Altschul, S.F., Lewin, A., Strand, T., Haugen, T., Klinkenberg, G., Kotlar, H., Valla, S., Drabløs, F. and Wentze, A. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: A New Generation of Protein Database Search Programs. *Nucleic Acids Research*. 25: 3389-3402.

Amirouche, R. and Misset, M.T. 2009. Flore spontanée d'Algérie: Différenciation écogéographique des espèces et polyploïdie. *Cahiers Agricultures*. 186: 474–480.

Andreazza, R., Antonioli, Z.I., Oliveira, V.L., Leal, L.T., Junior, C.A.M. and Pieniz, S. 2008. Mycorrhizal association studies in six native forestry species of Rio Grande do Sul state. *Ciência Florestal*. 18: 339-346.

Angel, S., Silva-Flores, M., Cervantes-Badillo, M., Rosales-Saavedra, M., Islas-Osuna, M. and Casas-Flores, S. 2011. The Plant Growth-Promoting Fungus *Aspergillus ustus* Promotes Growth and Induces Resistance Against Different Lifestyle Pathogens in *Arabidopsis thaliana*. *J. Microbiol. Biotechnol*21(7), 686–696

APG IV. 2016: Angiosperm Phylogeny Group [APG] (2016) – An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG IV. Bot. J. Linn. Soc. 181: 1–420

APG III : Chase M. W. et . Reveal, J. L. 2009. « A phylogenetic classification of the land plants to accompany APG III ». Bot. J. Linn. Soc. 161: 122-12

Appuhn, A., Joergensen, R.G. 2006. Microbial colonization of roots as a function of plant species, Soil Biol. Biochem. 38(5): 1040–1051.

Augé, R. 2011. Water relations, drought and vesicular-arbuscular mycorrhizal symbiosis. Mycorrhiza. 11: 3–42.

Austin, A. T., Yahdjian, L., Stark, J. M., Belnap, J., Porporato, A., Norton, U. and Schaeffer, S. M. 2004. Water pulses and biogeochemical cycles in arid and semiarid ecosystems. Oecologia. 141(2): 221-235.

Azcon-Aguilar, C., Palenzuela, J., Roldan, A., Bautist, S., Vallejo, R. and Barea, J.M. 2003. Analysis of the mycorrhizal potential in the rhizosphere of representative plant species from desertification-threatened Mediterranean shrub lands. Appl. Soil Ecol. 22:29-37

Bahram, M., Harend, H., and Tedersoo, L. 2014. Network perspectives of ectomycorrhizal associations. Fungal Ecology. 7: 70-77.

Baize, D. et Jabiol, B. 1995. Guide pour la description des sols. Editions INRA. 56p

Baldock Jeffrey, A., Nelson Paul N. 2000. Soil organic matter, Handbook of Soil Science, Boca Raton USA, CRC Press. Pp 25-84.

Bani Ameer, F. 2000. Phenological phases of *Argania spinosa* (L.) Skeelsflower. For genetics. 7 : 333-338.

Barnett, H.L. and Hunter, B.B. 1998. Illustrated genera of imperfect fungi, 4th edition. The American Phytopathological Society: Minnesota, USA

Baron, N.C., Costa, N.T.A. and Mochi, D.A. 2018. First report of *Aspergillus sydowii* and *Aspergillus brasiliensis* as phosphorus solubilizers in maize. Ann Microbiol. 68: 863–870.

Barrow, J. R. and P. Osuna. 2002. Phosphorus solubilization and uptake by dark septate fungi in fourwing saltbush, *Atriplex canescens* (Pursh). Nutt. J. Arid Environ. 51: 449-459.

- Baumer, M. et Zeraia, L. 1999.** La plus continentale des stations de l'arganier en Afrique du Nord. Rev For Fr.3 : 446-450.
- Beddiar, A., Adouane, M., Boudiaf, I. and Fraga A. 2015.** Mycorrhizal status of main spontaneous or introduced forest trees in El Tarf province (Algerian North-east). The Online Journal of Science and Technology. 5(2):1-4.
- Benadjiba, N., De Leiris, J., Lyan, B., Derouiche, A., Mokhtar, N., et Aguenou, H. 2002.** Effet de l'huile d'argan sur la contractilité de l'aorte : susceptibilité au stress oxydatif, oléagineux. corps gras, lipides. 13 : 76-80.
- Bencherif, K., Boutekrabet, A., Fontaine, J., Laruelle, F., Dalpè, Y. and Lounès-Hadj Sahraoui, A., 2015.** Impact of soil salinity on arbuscular mycorrhizal fungi biodiversity and microflora biomass associated with *Tamarix articulata* Vahl rhizosphere in arid and semi-arid Algerian areas. Sci. Total Environ. 533: 488–494
- Bending, G. D., Turner, M. K. and Jones, J. E. 2002.** Interactions between crop residue and soil organic matter quality and the functional diversity of soil microbial communities. Soil Biol. Biochem. 34(8): 1 073–1 082.
- Bending, G.D., Turner, M.K., Jones, J.E. 2002.** Interactions between crop residue and soil organic matter quality and the functional diversity of soil microbial communities. Soil Biol. Biochem. 34: 1073-1082.
- Benjamin, P.K., Anderson, R.C. and Liberta, A.E. 1989.** Vesicular-arbuscular mycorrhizal ecology of little bluestem across a prairie-forest gradient. Can J Bot. 67:2678–2685.
- Benkheira, A. 2009.** L'arganeraie Algérienne, Bultin d'information –laconservation de la biodiversité et gestion durable des ressources naturelles. 09.16p.
- Bennani, H., Drissi, A., Giton, F., Kheuang, L., Fiet, J. And Adlouni, A., 2007.** Antiproliferative effect of polyphenols and sterols of virgin argan oil on human prostate cancer cell lines. Cancer Investigation. 24 (6): 588-592.
- Bensassi, S. 2010.** Essais d'étude comparative de la microflore de deux type de sol /. Mémoire : de Master : Microbiologie générale et biologie moléculaire des microorganismes. ., Université Mentouri. 27p.
- Bentivenga, S.P. and Morton, J.B. 1994.** Stability and heritability of fatty acid methyl ester profiles of glomalean endomycorrhizal fungi. Mycol Res. 98:1419–1426

Berrougui, H., Cloutier, M., Maxim, I. and Khalil, A. 2006. Phenolic-extract from argan oil (*Argania spinosa* L.) inhibits human low-density lipoprotein (LDL) oxidation and enhances cholesterol efflux from human THP-1. macrophages Atherosclerosis. 184: 389–396.

Bezzala, A., 2005. Essai d'introduction de l'arganier (*Argania spinosa* (L.) Skeels) dans la zone M'doukel et évaluation de quelques paramètres de résistance à la sécheresse, Mémoire de magistère en science agronomiques –option : Forêt et conservation des sols, Université Hadj Lakhdar Batna. 143p.

Bhupinderpal, S., Rengel, Z., Bowden, J.W. 2006. Carbon, nitrogen and sulphur cycling following incorporation of canola residue of different sizes into a nutrient-poor sandy soil. Soil Biol. Biochem. 38: 32-42.

Bidartondo, M. 2005. The evolutionary ecology of myco-heterotrophy. New Phytologist. 167:335–352.

Bidartondo, M. and Bruns, T. 2002. Fine-level mycorrhizal specificity in the Monotropoideae (Ericaceae): specificity for fungal species groups. Molecular Ecology. 11:557–569.

Bidartondo, M., Read, D., Trappe, J., Merckx, V., Ligrone, R. and Duckett, J. 2011. The dawn of symbiosis between plants and fungi. Biology Letters 7:574–577

Bligh, E.G., Dyer W.J. 1959. A lipid method of total lipid extraction and purification. Can. J. Biochem. 37:911-917.

Blondel, J., Aronson, J., Bodiou, J.Y., and Boeuf, G. 2010. The Mediterranean Region: Biological Diversity in Space and Time. Oxford: Oxford University Press.

Boehler, C. 2012. Modélisation du pH du sol et son influence sur la distribution des espèces et des communautés végétales dans les Alpes vaudoises. Travail de Master ès Sciences en Biogéosciences Département d'Ecologie et Evolution Université de Lausanne. 65p.

Bouabdelli, Z., Belhadj, S., Smail-Saadoun, N., Mevy, J.P. and Notonnier R. 2018. Influence de l'aridité sur la variation de la colonisation mycorrhizienne arbusculaire chez cinq populations naturelles algériennes du pistachier de l'atlas (*Pistacia atlantica* desf.). Revue d'Ecologie, Terre et Vie. 73 (3) : 330-344.

Boukhobza, M. et Pichon- Prum, N. 1988. L'arganier : ressource économiques et médicinales pour le Maroc. Phytothérapie. 27 : 21-26.

- Brody, J.R. and Kern, S. 2004.** Sodium boric acid, a Tris-free, cooler conductive medium for DNA electrophoresis. *Biotechniques*. 36:214-6.
- Brody, JR., Kern, SE. 2004.** Sodium boric acid: a Tris-free, cooler conductive medium for DNA electrophoresis. *Biotechniques* 36: 214–215.
- Brundrett, M. 2004.** Diversity and classification of mycorrhizal associations. *Biological Reviews*. 79(3): 1464-793
- Brundrett, M. and Tedersoo, L. 2018.** Evolutionary history of mycorrhizal symbiosis and global host plant diversity. *New Phytologist* 220(4):1108–1115
- Brundrett, M., Bougher, N.J., Dell, B., Grove, T. and Malajczuk, N. 1996.** Working with mycorrhizas in forestry and agriculture. ACIAR, Canberra, Australia. 32p.
- Buee, M., Reich, M., Murat, C., Morin, E., Nilsson, R. H., Uroz, S., Martin, F. 2009.** 454 Pyrosequencing analyses of forest soils reveal an unexpectedly high fungal diversity. *New Phytol.* 184(2): 449-456.
- Buzin, I.S., Makarov, M.I., Streletskii, R.A. 2018.** Quantitation of Ergosterol as a Mycorrhizal Symbiosis Biomarker. *Russ J Ecol.* 49: 186–189 (2018).
- Calonne, C. 2007.** Maroc : l'huile d'argan, une affaire de femmes. magazine de voyage reçu (*Absolute travail Mag*).88 : 1-12.
- Calonne, M. 2012.** Impact des hydrocarbures aromatiques polycycliques sur le métabolisme lipidique et le transport du phosphore chez le champignon mycorrhizien à arbuscules *Rhizophagus irregularis*. *Biochimie, Biologie Moléculaire*. Université du Littoral Côte d'Opale.
- Cameron, D. D., Neal, A. L., van Wees, S. C. M., and Ton, J. 2013.** Mycorrhiza-induced resistance: more than the sum of its parts? *Trends Plant Sci.* 18: 539–545
- Campos-Soriano, L., Garcia-Martinez, J. and Segundo B. 2012.** The arbuscular mycorrhizal symbiosis promotes the systemic induction of regulatory defence-related genes in rice leaves and confers resistance to pathogen infection. *Mol Plant Pathol.* 13:579–592
- Cao, R., Liu, X., Gao, K., Mendgen, K., Kang, Z. and Gao J. 2009.** Mycoparasitism of endophytic fungi isolated from reed on soilborne phytopathogenic fungi and production of cell wall-degrading enzymes in vitro. *Curr. Microbiol.* 59: 584–592
- Castellano, M. A., Trappe, J. M., Maser, Z. and Maser, C. 1989.** Key to Spores of the Genera of Hypogeous Fungi of North Temperate Forests : With Special Reference to Animal Mycophagy. Mad River Press. Eureka

CBS Laboratory manual. Laboratory Manual Series no. 2.

Charrouf, Z. 1998. Valorisation de l'huile d'argan par des groupements de femmes. Colloque international sur les ressources végétales "L'arganier et les plantes des zones arides et semi-aride". Agadir. 23-25 Avril 1998.

Charrouf, Z. 2000. L'arganier est vital á l'économie du sud-ouest de Maroc. Biofutur. 220 : 54-57.

Charrouf, Z. and Guillaume, D. 2009. Sustainable Development in Northern Africa: The Argan Forest Case. Sustainability. 1(4): 1012-1022.

Charrouf, Z. 2002. L'huile d'argan, une prodigieuse vitalité née au désert. Espérance médicale. Tom 9: 87.

Chaussod, R., Adlouni, A., Christon, R., 2005. L'arganier et l'huile d'argane au Maroc : vers la mutation d'un système agroforestier traditionnel ? Enjeux et contribution de la recherche. Cahiers Agricultures. 14(4) : 352-356

Chemli, R., 1997. Plantes médicinales et aromatiques de la flore de Tunisie. In: V. H. Heywood and M. Skoula Eds. Identification of Wild Food and Non-Food Plants of the Mediterranean Region (Chania: CIHEAM). 22: 119–125.

Clasen, B., Silveira, A., Baldoni, D., Montagner, D., Jacques, R., Antonioli, Z. 2018. Characterization of Ectomycorrhizal species through molecular biology tools and morphotyping. Sci. Agric. 75(3):246-254.

Collins, S. L., Sinsabaugh, R. L., Crenshaw, C., Green, L., Porras-Alfaro, A., Stursova, M., Zeglin, L. H. 2008. Pulse dynamics and microbial processes in arid land ecosystems. Journal of Ecology. 96(3): 413-420.

Coughlan, A. P., Dalpé, Y., Lapointe, L., Piché, Y. 2000. Soil pH-induced changes in root colonization, diversity, and reproduction of symbiotic arbuscular mycorrhizal fungi from healthy and declining maple forests. Canadian Journal of Forest Research. 30(10): 1543-1554.

Courty, P.E., Buée, M., Diedhiou, A. G., Frey-Klett, P., Le Tacon, F., Rineau, F. and Garbaye, J. 2010. The role of ectomycorrhizal communities in forest ecosystem processes: New perspectives and emerging concepts. Soil Biology and Biochemistry. 42(5): 679-698.

- Crush, J.R. 1973.** The effect of *Rhizophagus tenuis* mycorrhizas on ryegrass, cocksfoot and sweet vernal. *New Phytologist*. 72:965–973
- De Bary A. 1879.** De la symbiose. *Rev. Int. Sci.* 3: 301–309.
- Derkaoui, N. 2018.** Evaluation du potentiel mycorhizien sous *Acaia saligna* introduit à Terga et étude de leur diversité. Thèse de doctorat. Université Oran1. 209p.
- Derouiche, A., Cherki, M., Drissi, A., Bamou, Y., El Messal, M., Idrissi-Oudghiri, A., Lecerf, J.M. And Adlouni, A. 2005.** Nutritional Intervention Study with Argan Oil in Man: Effects on Lipids and apolipoproteins. *Ann Nutr Metab.* 49: 196-201.
- Deshmukh, S., Huckelhoven, R., Schafer, P., Imani, J., Sharma, M., Weiss, M., Waller, F. and Kogel, K. 2006.** The root endophytic fungus *Serendipita indica* requires host cell death for proliferation during mutualistic symbiosis with barley. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 103:18450–18457
- Dexheimer, J., et Gérard, J. 1993.** Application de quelques techniques cytochimiques à l'étude des interfaces des ectendo-mycorhizes de *Monotrope* (*Monotropa hypopitys*L.). *Acta Bot. Gallica*,140: 459–472.
- Diagne, N., Ngom, M., Djighaly, P., Fall, D., Hocher, V. and Svistoonoff, S. 2020.** Roles of Arbuscular Mycorrhizal Fungi on Plant Growth and Performance: Importance in Biotic and Abiotic Stressed Regulation. *Diversity.* 12(10):370
- Diaz, A., Green, I.D. and Tibbett, M. 2008.** Re-creation of heathland on improved pasture using topsoil removal and sulphur amendments: Edaphic drivers and impacts on ericoid mycorrhizas. *Biological Conservation.* 141:1628–1635
- Diaz, A., Green, I.D., Benvenuto, M. and Tibbett, M. 2006.** Are ericoid mycorrhizas a factor in the success of *Calluna vulgaris* heathland restoration?. *Restoration Ecology.* 14:187–195
- Díaz-Barradas, M. C., Zunzunegui, M., Ain-Lhout, F., Jáuregui, J., Boutaleb, S., Álvarez-Cansino, L., Esquivias, M. P. 2010.** Seasonal physiological responses of *Argania spinosa* tree from Mediterranean to semi-arid climate. *Plant and Soil.* 337(1-2): 217-231.
- Douglas, A. 2010.** The symbiotic habit. New Jersey: Princeton University Press
- Drissi, A., Gironaj, R., Cherki, M., Godas, G., Derouiche, A., Elmessal, M., Saile, R., Kettani, A., Sola, R. Masanal, A. and Adlouni, A. 2004.** Evidence of hypolipemiant and antioxidant properties of argan oil derived from the argan tree (*Arganias pinosa*). *Clin.Nutr.* 23:1159 -1166.
- Duke, J. 1992.** Handbook of biologically active phytochemicals and their activities. CRS Press Inc. Boca Raton, Florida. 198p.

Dupre, C., Chevalier, G., Palanzona, M. et Biocca, E. 1993. Caractérisation des mycorhizes de différents Tuber par l'étude du polymorphisme enzymatique. *Cryptogamie Mycologie*. 14 : 163-170.

Ebada, S.S., El-Neketi, M., Ebrahim, W., Mándi, A., Kurtán, T., Kalscheuer, R., Müller, W.E.G., Proksch, P., 2018. Cytotoxic secondary metabolites from the endophytic fungus *Aspergillus versicolor* KU258497. *Phytochem. Lett.* 24: 88–93

Ebada, S.S., El-Neketi, M., Ebrahim, W., Mándi, A., Kurtán, T., Kalscheuer, R., Müller, W. and Proksch, P. 2018. Cytotoxic secondary metabolites from the endophytic fungus *Aspergillus versicolor* KU258497. *Phytochem Lett.* 24:88–93.

Edgar, R. C., Flyvbjerg, H. 2015. Error filtering, pair assembly and error correction for next-generation sequencing reads. [Evaluation Studies]. *Bioinformatics*. 31(21): 3476-3482.

Egerton-Warburton, L.M., Querejeta, J.I., F Allen, M.S. and Finkelman L. 2005. *Mycorrhizal Fungi*, Elsevier Ltd. 33-542.

EL Abed, A. 2007. Réactivité thermique et cinétique de dégradation du bois d'arganier – Application à l'élaboration de charbon actif par activation chimique à l'acides phosphoriques. thèse de doctorat en chimie, spécialité : Chimie-physique, université Mohammed V- AGDAL. Rabat. 198p

El Babili, F., Bouajila, J., Fouraste, I., Valentin, A., Mauret, S. and Moulis, C. 2009. Chemical study, antimalarial and antioxidant activities, and cytotoxicity to human breast cancer cells (MCF7) of *Argania spinosa*. *Phytomed.* 17: 57-160.

El-Agamy, D.S, Ibrahim, S., Ahmed, N., Khoshhal, S., Abo-Haded, H., Elkablawy, M., Aljuhani, N., Mohamed, G. Aspernolide, F. 2019. A new cardioprotective butyrolactone against doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Int Immunopharmacol.* 72:429-436.

El-Agamy, D.S., Ibrahim, S.R.M., Ahmed, N., Khoshhal, S., Abo-Haded, H.M., Elkablawy, M.A., Aljuhani, N., Mohamed, G.A., 2019. Aspernolide F, as a new cardioprotective butyrolactone against doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Int. Immunopharmacol.* 72: 429–436

El-Hawary, S., Mohammed, R., Bahr, H., Attia, E., El-Katatny, M., Abelyan, N., Al-Sanea, M., Moawad, A. and Abdelmohsen, U. 202. Soybean-associated endophytic fungi as potential source for anti-COVID-19 metabolites supported by docking analysis. *J Appl Microbiol.* 2380 :1-19

Ellouz, O., 2011. Diversité des champignons endophytes mycorrhiziens et de classe II chez le pois chiche, et influence du génotype de la plante. Thèse doctorat, université de Montreal, 113 p.

Emberger, L. 1960. Traité de botanique systématique. Les végétaux vasculaires. Tomes II. Pp 852-855.

Faucher, J. et Lachaine, R. 2012. Campbel Biologie. 9eme edition. ERPI. 1458P

Ferradous, A., Bani-Ameur, F. and Dupuis, P. 1996. Climatstationel, phenologie et fructification de l'arganier *Argania spinosa* L.Skeels. Actes del'Institut Agronomique et Veterinaire (Maroc).17 : 51-60.

Fesel, P. and Zuccaro, A. 2016. Dissecting endophytic lifestyle along the parasitism/mutualism continuum in Arabidopsis. Current Opinions in Microbiology. 32:103–112

Fesel, P., Zuccaro, A. 2016.Dissecting endophytic lifestyle along the arasitism/mutualism continuum in Arabidopsis.Current Opinion in Microbiology.32 : 103-112

Field, K., Rimington, W., Bidartondo, M., Allinson, K., Beerling, D., Cameron, D., Duckett, J., Leake, J. and Presse, S. 2015. First evidence of mutualism between ancient plant lineages (Haplomitriopsida liverworts) and Mucoromycotina fungi and its response to simulated Palaeozoic changes in atmospheric CO₂. New Phytologist.205:743–756

Finlay, R. D. 2008. Ecological aspects of mycorrhizal symbiosis: with special emphasis on the functional diversity of interactions involving the extraradical mycelium. J Exp Bot. 59(5): 1115-1126.

Flores-Renteria, L., Lau, M. K., Lamit, L. J., Gehring, C. A. 2014. An elusive ectomycorrhizal fungus reveals itself: a new species of *Geopora* (Pyronemataceae) associated with *Pinus edulis*. Mycologia. 106(3): 553-563.

Foo, E. 2013. Auxin influences strigolactones in pea mycorrhizal symbiosis. Journal of Plant Physiology. 170: 523–528.

Fortin, J.A., Plenchette ,C. and Piché, Y. 2008. Les mycorhizes la nouvelle révolution verte. (Ed) Quae et multimondes. Québec. 9 :148.

Frey, B., Buser, H., and Schüepp, H. 1992. Identification of ergosterol in vesicular-arbuscular mycorrhizae. Biol.Fertil. Soils. 13(4): 229–234.

Frey, B., Buser, H.R. and Schüepp, H. 1992. Identification of ergosterol in vesicular-arbuscular mycorrhizae. Biology and Fertility of Soils. 13: 229–234.

- Frostegard, A., Biath, E. and Tunlid, A. 1993.** Shifts in the structure of soil microbial communities in limed forests as revealed by phospholipids fatty acid analysis. *Soil Biol. Bio-chem.* 25:723-730.
- Gao, H., Li, G., Lou, H.X., 2018.** Structural diversity and biological activities of novel secondary metabolites from endophytes. *Molecules.* 23:646.
- Garcia-Montero, L.G., Quintana, A., Valverde, A. and Dıozle I. 2009.** Calcareous amendments in truffle culture. A soil nutrition hypothesis. *Soil biology biochemistry.* 41: 1227-1232.
- Gaston, K.J., 1991,** How large is a species geographic range?. *Oikos.* 61(3): 434–438.
- Gerdemann, J.W. and Nicolson, T.H. 1963.** Spores of mycorrhizal *Endogone* species extracted from soil by wet sieving and decanting. *Mycol. Soc.* 46: 235-246.
- Gerdemann, J.W. et Nicolson, T.H. 1963.** Spores for mycorrhizal *endogone* species extracted from soil by wet sieving and decanting. *Trans. Br. Mycol. Soc.,* 46: 235-244
- Gianinazzi-Pearson, V., Morandi, D., Dexheimer, J. and Gianinazzi S. 1981.** Ultrastructural and ultracytochemical features of a *Glomus tenuis* mycorrhiza. *New Phytologist.* 88:633–639
- Gonzalez-Teuber, M., Vilo, C. and Bascunan-Godoy, L. 2017.** Molecular characterization of endophytic fungi associated with the roots of *Chenopodium quinoa* inhabiting the Atacama Desert, Chile. *Genom Data.* 11, 109-112.
- Gordon, G. J. and Gehring, C. A. 2011.** Molecular characterization of pezizalean ectomycorrhizas associated with pinyon pine during drought. *Mycorrhiza.* 21(5): 431-441.
- Goto, B.T., Silva, G.A., Assis, D., Silva, D.K., Souza, R.G., Ferreira, A.C. and Oehl F. 2012.** Intraornatosporaceae (Gigasporales), a new family with two new genera and two new species. *Mycotaxon.* 119(1): 117-132.
- Graham, J. H., Hodge, N. C. and Morton, J. B. 1995.** Fatty acid methylester profiles for characterisation of Glomalean fungi and their endomycorrhizae. *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 58–64.
- Grishkan, I. and Nevo, E. 2010.** Spatiotemporal distribution of soil microfungi in the Makhtesh Ramon area, central Negev desert, Israel. *Fungal Ecology.* 3(4):326-337.
- Grunig, C., Queloz, V. and Sieber, T. 2011.** Structure of diversity in dark septate endophytes: from species to genes. *Forestry Sciences.* 80:3–30

Guimaraesjr, P., Guimaraes, P. 2006. Improving the analyses of nestedness for large sets of matrices. *Environmental Modelling & Software*. 21(10): 1512-1513.

Guinel, F. and Hirsch, A.M. .2000. The involvement of root hairs in mycorrhizal associations. In: Ridge RW, Emos AMC (eds) *Cell and molecular biology of plant root hairs*. Springer. Berlin.285–310

Guyon, M. 2008. Analyse socio-territoriale de la filière argan dans la province d'Essaouira (sud-ouest marocain) – La valorisation économique d'une ressource naturelle est-elle garante d'un développement socialement durable ?. Mémoire de Master 2 recherche, Mondialisation et développement. Université de Province. 78P

Hafeeze, B., Asim, M., Siddiqui, I., Adhami, V., Murtaza, I. and Mukhtar, H. 2008. Delphinidin, a dietary anthocyanidin in pigmented fruits and vegetables: a new weapon to blunt prostate cancer growth. *Cell Cycle*.7(21) : 3320-3326.

Hall, I.R. 1984. Taxonomy of VA mycorrhizal fungi. In: *VA Mycorrhiza* (Eds.) Powell, C.L.I. and Bagyaraj D.J. CRC Press, Boca Raton, FL. . 57-94.

Haro, R., and Benito, B. 2019. The Role of Soil Fungi in K⁺ Plant Nutrition. *International journal of molecular sciences*. 20(13): 3169.

Harrouf, Z., Benomar, M. et Guillaume, D., 2007. Huile d'argan et système cardiovasculaire. *Cœur et vaisseaux*. 4 : 50-55.

Harvey, A. E., Larsen, M. J. and Jurgensen, M. F. 1976. Distribution of ectomycorrhizae in a mature douglas-fir/larch soil in western Montana. *For Sci*. 22, 393-398

Hiruma, K., Nina, G., Soledad, S., Marcel, B., Richard, J and O'Connell, P. 2016. Root Endophyte *Colletotrichum tofieldiae* Confers Plant Fitness Benefits that Are Phosphate Status Dependent. *Cell*. 165: 1–11

Hoysted, G.A., Kowal, J., Jacob, A., Rimington, W.R., Duckett, J.G., Pressel, S., Orchard, S., Ryan, M.H., Field, K.J. and idartondo, M.I. 2018. A mycorrhizal revolution. *Curr. Opin. Plant. Biol*. 44: 1-6.

Huang, WY., Cai, YZ., Hyde, K.D. 2007. Endophytic fungi from *Nerium oleander* L (Apocynaceae): main constituents and antioxidant activity. *World J Microbiol Biotechnol*. 23: 1253–1263.

Hynson, N., Madsen, T.P., Selosse, M.A., Adam, I., Ogura-Tsujita, Y., Roy, M. and Gebauer, G. 2013. The physiological ecology of mycoheterotrophy. In: Merckx V, ed. *Mycoheterotrophy—the biology of plants living on fungi*. New York: Springer. 297–342.

Ihrmark, K., Bodeker, I. T., Cruz-Martinez, K., Friberg, H., Kubartova, A., Schenck, J. and Lindahl, B. D. 2012. New primers to amplify the fungal ITS2 region--evaluation by 454-sequencing of artificial and natural communities. *FEMS Microbiol Ecol.* 82(3): 666-677.

INVAM. 2016. International Culture Collection of (Vesicular) Arbuscular Mycorrhizal Fungi. West Virginia University, Morgantown, West Virginia. URL: <http://invam.wvu.edu/the-fungi/species-descriptions>.

ISO 2005:10390 Soil quality -Determination of pH

ISO 2009:11277 Soil quality - Determination of particle size distribution in mineral soil material - Method by sieving and sedimentation.

ISO 2014:18227: Soil quality — Determination of elemental composition by X-ray fluorescence

Jansa, J., Šmilauer, P., Borovička, J., Hřelová, H., Forczek, S., Slámová, K., Řezanka, T., Rozmoš, M., Bukovská, P. and Gryndler, M. 2020, Dead *Rhizophagus irregularis* biomass mysteriously stimulates plant growth. *Mycorrhiza.* 30: 63–77.

Jensen, E.S. 1994. Mineralization, immobilization of nitrogen in soil amended with low C/N ratio plant residues with different particle sizes. *Soil Biol. Biochem* 26: 519-521.

Jeon, G., Park, M., Yoon, D., Shin, C., Sin, H., Um, S. 2005. Antitumoractivity of spinasterol isolated from *Pueraria* roots. *Exp Mol Med.*37(2): 111-120

Jia, M., Chen, L., Xin, H., Zheng, C., Rahman, K., Han, T. and Qin, L. 2016. A Friendly Relationship between Endophytic Fungi and Medicinal Plants: A Systematic Review *Front. Microbiol.* 7: 1-14.

Jiang, C., Lamblin, A., Steller, H. and Thummel, C. 2000. A steroidtriggered transcriptional hierarchy controls salivary gland cell death during *Drosophila* metamorphosis. *Mol. Cell.* 5(3): 445-455.

Johnson, D., Vandenkoornhuysen, P.J., Leake, J.R., Gilbert, L., Booth, R.E., Grime, J.P., Young, J.P.W. and Read, D.J. 2004. Plant communities affect arbuscular mycorrhizal fungal diversity and community composition in grassland microcosms. *New Phytologist.* 161: 503– 515.

Joner, E.J. et Leyval, C. 2003. Rhizosphere gradients of polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) dissipation in two industrial soils and the impact of arbuscular mycorrhiza. *Environmental Science & Technology.*37 : 2371-2375

- Jumpponen, A. and Trappe J. 1998.** Dark septate endophytes: a review of facultative biotrophic root-colonizing fungi. *New Phytologist*. 140:295–310
- Jung, S.C., Martinez-Medina, A. and Lopez-Raez, J.A. 2012.** Mycorrhiza-induced resistance and priming of plant defenses. *Journal of Chemical Ecology*. 38 (6): 651–664
- Kane, A., 1997.** L'après barrage dans la vallée du fleuve Sénégal: Modification hydrologiques, morphologique, géochimique et sédimentologiques. Conséquences sur le milieu naturel et les aménagements hydrologiques, Thèse de doctorat d'Etat de Géographie physique. UCAD. 551p.
- Kariman, K., Barker, S.J. and Tibbett, M. 2018.** Structural plasticity in root-fungal symbioses: diverse interactions lead to improved plant fitness. *Peer J*. 6: 6030-6045.
- Kehri, H., Akhtar, O., Zoomi, I. and Pandey, D. 2018.** Arbuscular Mycorrhizal Fungi: taxonomy and its Systematics . *International Journal of Life Sciences Research*. 6(4):58-71.
- Kenny, L. and De Zborowski, I. 2007.** Atlas de l'arganier et de l'arganeraie. Rabat, Maroc: IAV Hassan II.
- Khallouki, F., Spiegelhalder, B, Bartsch, H, Owen, RW. 2005.** Secondary metabolites of argan tree (Morocco) may have disease prevention properties. *J. Biotechnol*. 4: 381-388.
- Khallouki, F., Younos, C., Soulimani, R., Oster, T., Charrou, Z., Spiegelhalder, B., Bartsch, H. And Owen, R. W. 2003.** Consumption of argan oil (Morocco) with its unique profile of fatty acids, tocopherols, squalene, sterols and phenolic compounds should confer valuable cancer chemopreventive effects. *Eur. J., Cancer Prev*. 12 : 67-75.
- Khalouki, F. 2003.** Recherche des substances naturelles aux vertus chimioprotectrices, contribution à l'étude ethnobotanique et phytochimiques de trois plantes médicinales Africaines a profils anti radicalaires. thèse de doctorat en sciences de la vie. université de Metz. 226p.
- Khan, A., Hussain, J., Al-Harrasi, A., Al-Rawahi, A. and Lee, I. 2015,** Endophytic fungi: resource for gibberellins and crop abiotic stress resistance. *Crit Rev Biotechnol*. 35(1):62-74.
- Khayy, S., Azza, N.E., Gaboun, F., Pirro, S., Badad, O., Claros, M.G., Lightfoot, D.A., Unver, T., Chaouni, B. and Merrouch, R. 2018.** First draft genome assembly of the Argane tree (*Argania spinosa*). *F1000Research* 7: 1310-1328.
- Kim, H.Y., Choi, G.J., Lee, H.B., Lee, S.W. and Kim H.K. 2007.** Some fungal endophytes from vegetable crops and their anti-oomycete activities against tomato late blight. *Lett. Applied Microbiol*. 44: 332-337.

Kim, J.Y. and Baek, S.Y. 2011. Molecular and morphological identification of fungal species isolated from *Bealmijang meju*. *J. Microbiol. Biotechnol.* 12: 1270–1279.

Kjeldahl, J. 1883. A new method for the determination of nitrogen in organic matter. *Zeitschreft fur Analytische Chemie.* 22 : 366.

Koske, R.E. and Tessier, B. 1983. A convenient permanent slide mounting medium. *Mycological Society of America Newsletter.* 34: 59-60

Kowal, J., Arrigoni, E. and Serra, J. 2020. Prevalence and phenology of fine root endophyte colonization across populations of *Lycopodiellainundata*. *Mycorrhiza.* 30: 577–587

Kowal, J., Pressel, S., Duckett, J.G., Bidartondo, M.I. and Field, K.J. 2018. From rhizoids to roots? Experimental evidence of mutualism between liverworts and ascomycete fungi. *Annals of Botany.* 121(2):221–227.

Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., Tamura, K. 2018. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution.* 35:1547-1549.

Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C. and Tamura, K. 2018. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. *Molecular biology and evolution.* 35(6): 1547–1549.

Labidi, M., Calonne, F., BenJeddi, D., Debiane, S., Rezgui, F., Laruelle, B., Tisserant, A., Grandmougin-Ferjani, A. and Lounès-Hadj, S. 2011. Calcareous impact on arbuscular mycorrhizal fungus development and on lipid peroxidation in monoxenic roots. *Phytochemistry.* 72: 2335-2341.

Lahrman, U., Ding, Y., Banhara, A., Rath, M., Hajirezaei, M., Dohlemann, S., Von Wirßen, N., Parniske, M. and Zuccaroa A. 2013. Host-related metabolic cues affect colonization strategies of a root endophyte. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 110:13965–13970

Lata, R., Chowdhury, S., Gond, S.K. and White, Jr. 2018. Induction of abiotic stress tolerance in plants by endophytic microbes. *Lett Appl Microbiol.* 66(4):268-276.

Laurent, P. 1995. Contribution à l'étude des protéines régulées par la symbiose chez l'ectomycorhize d'Eucalyptus -*Pisolithus*. Caractérisation de mannoprotéines pariétales chez le basidiomycète *Pisolithus tinctorius*. Mémoire de thèse. University Henri Poincaré - Nancy .

Lee, J., Lee, S., Peter, I. and Young, J. 2008. Improved PCR primers for the detection and identification of arbuscular mycorrhizal fungi. *FEMS Microbiol Ecol.* 65(2):339-349.

Leibold, M. A., Holyoak, M., Mouquet, N., Amarasekare, P., Chase, J. M., Hoopes, M. F. and Gonzalez, A. 2004. The meta community concept: a framework for multi-scale community ecology. *Ecology Letters.* 7(7): 601-613.

Lenoir, I., Fontaine, J., Sahraoui, A. 2016. Arbuscular mycorrhizal fungal responses to abiotic stresses: A review. *Phytochemistry.* 123: 4-15.

Leyval, C. et Joner, E.J. 2001. Bioavailability of heavy metals in the mycorrhizosphere. Dans: Trace elements in the rhizosphere, CRC Press. 165-185.

Lin, K., Limpens, E., Zhang, Z. and Huang, S. 2014. Single nucleus genome sequencing reveals high similarity among nuclei of an endomycorrhizal fungus. *PLOS Genetics.* 10:40-78

Lobuglio, K.F., Wilcox, H.E. 1988. Growth and survival of ectomycorrhizal and ectendomycorrhizal seedlings of *Pinus resinosa* on iron tailings. *Canadian Journal of Botany.* 66:55–60.

López-Ráez, J. A. 2016. How drought and salinity affect arbuscular mycorrhizal symbiosis and strigolactone biosynthesis?. *Planta.* 243(6): 1375–1385.

López-Ráez, J. A. 2016. How drought and salinity affect arbuscular mycorrhizal symbiosis and strigolactone biosynthesis? *Planta.* 243: 1375–1385

Loro, M., Valero-Jiménez, C. A., Nozawa, S., Márquez, L. M. 2012. Diversity and composition of fungal endophytes in semiarid Northwest Venezuela. *Journal of Arid Environments.* 85: 46-55.

Lotfi, N., Chahboun, N., El Hartiti, H., Kabouche, Z., El M'Rabet, M. et Berrabeh, M. 2015. Study of the antibacterial effect of Argan oil from Bechar region of Algeria on hospital resistant strains. *J Mater Environ Sci.* 6(9): 2476–2482

Lotmani B., Chouib, M., Boudjma, M. 2002. Germination et potentialites organogenes des embryons d'arganier (*Argania spinosa* L. Skeel) cultives in vitro. *Sciences & Technologie.* 18: 101-105.

Lucero, M. E., J. R. Barrow, P. Osuna, I. Reyes, and S. E. Duke. 2006. Enhancing native grass productivity by cocultivating with endophyte-laden calli. *Rangel. Ecol. Manage.* 61: 124-130.

- Lucero, M., Barrow, J., Osuna, P., and Reyes, I. 2006.** Plant fungal interactions in arid and semi-arid ecosystems: Large-scale impacts from microscale process. *J. Arid Environ.* 65: 276-284.
- Luginbuehl, L.H., Menard, G.N., Kurup, S., Van Erp, H., Radhakrishnan, G.V., reakspear, Oldroyd, G.E., Eastmond, P.J. 2017.** Fatty acids in arbuscular mycorrhizal fungi are synthesized by the host plant. *Science.* 356 1175–1178.
- Luginbuehl, L.H., Menard, G.N., Kurup, S., Van Erp, H., Radhakrishnan, G.V., Breakspear, A., Oldroyd, G.E.D., and Eastmond, P.J. 2017.** Fatty acids in arbuscular mycorrhizal fungi are synthesized by the host plant. *Science.* 356:1175–1178
- M'herit, O. 1989.** L'arganier: une espèce fruitière à usage multiple, Formation forestière continue, thème « l'arganier ». Division de recherche et d'expérimentations forestières. Rabat. Pp 59–64.
- Madigan, M.T., Matinoko J.M and Parker J. 1997.** Brok biology of microorganisms, Prentice Hall International, Inc. 8th Edition. New York.USA.
- Mandyam, K., Jumpponen, A. 2005.** Seeking the elusive function of the root-colonising dark septate endophytic fungi. *Studies in Mycology.* 53:173-189.
- Maren, A. K. 2002.** Identification of Common *Aspergillus* Species. Centraalbureau voor Schimmel cultures.Utrecht. 116p.
- Marina, S., Angel, M., Silva-Flores, M.A., Guadalupe, M., Badillo, C., Rosales-Saavedr, M.T., Auxiliadora Islas-Osuna, M. , Casas-Flores, S. 2011.** The Plant Growth-Promoting Fungus *Aspergillus ustus* Promotes Growth and Induces Resistance Against Different Lifestyle Pathogens in *Arabidopsis thaliana*. *J. Microbiol. Biotechnol.* 21(7): 686–696.
- Mariotte, P., Mehrabi, Z., Bezemer, T.M., De Deyn, G.B., Kulmatiski, A., Drigo, B., Veen, G.F., van der Heijden, M. and Kardol, P. 2018.** Plant-soil feedback: bridging natural and agricultural sciences. *Trends Ecol Evol.* 33:129–142.
- Marouf, K., Ighilhariz, Z., de Lajudie, P., Duponnois, R. and Bekki A. 2015.** Assessing the native arbuscular mycorrhizal symbioses to rehabilitate a degraded coastal sand dune In Algeria. *International Journal of Agriculture and Crop Sciences.* 8: 194-202.
- Martin, B.D. and Schwab, E. 2013.** Current usage of symbiosis and associated terminology. *International Journal of Biology* 5:32–45

- Martínez-García, L. B., Armas, C., Miranda, J. d. D., Padilla, F. M., Pugnaire, F. I. 2011.** Shrubs influence arbuscular mycorrhizal fungi communities in a semi-arid environment. *Soil Biology and Biochemistry*. 43(3): 682-689.
- Martinez-Medina, A., Flors, V., Heil, M., Mauch-Mani, B., Pieterse, C., Pozo M. and 2016.** Recognizing plant defense priming. *Trends Plant Sci*. 21: 818–822
- Martino, E., Morin, E., Grelet, G.A., Kuo, A., Kohler, A., Daghino, S., Barry, K.W., Cichocki, N., Clum, A., Dockter, R.B., Hainaut, M., Kuo, R.C., LaButti, K., Lindahl, B.D., Lindquist, E.A. and Perotto, S. 2018.** Comparative genomics and transcriptomics depict ericoid mycorrhizal fungi as versatile saprotrophs and plant mutualists. *New Phytologist*. 217:1213–1229
- Mathieu, C., Peiltein, F. 2003.** Analyses chimiques des sols, méthodes choisies. Tec et Doc. Pp. 25-30.
- Mebarki, M., Lamhamadi, S., Margolis, H. Zine El Abidine, A., Abourrah, M., Taimi A., 2006.** Mise au point d'un substrat de culture organique par compostage de la biomasse forestière pour la culture de l'Arganier (*Argania spinosa* L. Skeels) en pépinière forestière. Les premières assises de la recherche forestière « L'Arganier : un rempart contre la désertification ». Essaouira : 25 et 26 Mai
- Mbogne, T.J., Temegne, C., Hougmandan, P., Youmbi, E., Tonfack, L.B. and Ntsomboh-Ntsefong, G. 2015.** Biodiversity of arbuscular mycorrhizal fungi of pumpkins *Cucurbita* spp. under the influence of fertilizers in ferralitic soils of Cameroon and Benin. *Journal of Applied Biology and Biotechnology*. 3(05):001-010
- Meddad-Hamza, A., Beddiar, A., Gollotte, A Lemoine, M.C., Kuszala C. and Gianinazzi, S., 2010.** Arbuscular mycorrhizal fungi improve the growth of olive trees and their resistance to transplantation stress. *Afr. J. Biotechnol*. 9: 1159–1167
- Meyer, F.H. 1973.** Distribution of ectomycorrhizae in native and man-made forests. In: *Ectomycorrhizae their Ecology and Physiology* (Ed. by G. C. Marks and T. T. Kozlowski). Academic Press, New York. 79-105.
- M'hirit, O., Benzyane, M., Benchekroune, F., Elyousfi, S.M., Mabjeesh, S. J., Cohen, M. et Arieli, A. 2000.** In Vitro Methods for Measuring the Dry Matter Digestibility of Ruminant Feedstuffs: Comparison of Methods and Inoculums Source. *Journal of Dairy Science*. 83(10) :2289-2294.

Michelsen, A., Graglia, E. and Schmidt, I.K. 1999. Differential responses of grass and a dwarf shrub to longterm changes in soil microbial biomass C, N and P following factorial addition of NPK fertilizer, fungicide and labile carbon to a heath. *New Phytol.* 143: 523–538.

Mikola, P. 1965. Studies on the ectendotrophic mycorrhiza of pine. *Acta Forestalia Fennica.* 79:1–56.

Monteiro, M., Passamani, F., Terra, M., Silva M., Cirillo, M., Soilborne L. 2016. Fungi of the *Aspergillus* and *Penicillium* Genera in a Preserved Region of the Brazilian Cerrado Biome. *Journal of Microbiology Research.* 6(1): 14-22

Morton, J.B. and Benny, G.L. 1990. Revised classification of arbuscular mycorrhizal fungi (Zygomycetes): a new order, Glomales, two new suborders, Glomineae and Gigasporineae, and two new families, Acaulosporaceae and Gigasporaceae, with an emendation of Glomaceae. *Mycotaxon.* 37: 471-491.

Morton, J.B. and Redecker, D. 2001. Two new families of Glomales, Archaeosporaceae and Paraglomaceae, with two new genera *Archaeospora* and *Paraglomus*, based on concordant molecular and morphological characters. *Mycologia* 93 (1): 181-195

Msanda, F., El Aboudi, A. et Peltiern J.P., 2005. Biodiversité et biogéographie de l'arganeraie marocaine. *Cahiers Agricultures.* 14(4) :357-364.

Münzenberger, B. 1991. Losliche und zellwandgebundene Phenole in Mykorrhizen und nicht mykorrhizierten Wurzeln der Fichte (*Picea abies* [L.] Karst.) und des Erdbeerbaumes (*Arbutus unedo* L.) und ihre Bedeutung in der Pilz-WurzelInteraktion. PhD thesis. University of Tübingen. Germany.

Münzenberger, B., Kottke, I. and Oberwinkler F. 1992. Ultrastructural investigations of *Arbutus unedo*-*Laccaria amethystea* mycorrhiza synthesized in vitro. *Trees* 7:40–47.

Myers, N., Mittermeier, R.A., Mittermeier, C.G., Da Fonseca, G.A.B., and Kent, J. 2000. Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature.* 403(6772): 853–858.

Nakas, J.P. and Hagedorn C. 1990. Biotechnology of plant-microbe interactions. McGraw-Hill. USA

Ndoye, F., Kane, A., Mangaptché, E., Bakhoun, N., Sanon, A., Diouf, D., Sy, M., Baudoin, E., Noba, K. and Prin Y. 2012. Changes in land use system and environmental factors affect arbuscular mycorrhizal fungal density and diversity, and enzyme activities in rhizospheric soils of *Acacia senegal* (L.)Willd. *ISRN Ecology.* 2012 : 1-13

Netala, V. R., Kotakadi, V. S., Bobbu, P., Gaddam, S. A., and Tartte, V. 2016. Endophytic fungal isolate mediated biosynthesis of silver nanoparticles and their free radical scavenging activity and anti microbial studies. *3 Biotech. 6(2)* : 132.

Netala, V.R., Kotakadi, V.S., Bobbu, P., Gaddam, S.A., Tartte, V., 2016. Endophytic fungal isolate mediated biosynthesis of silver nanoparticles and their free radical scavenging activity and antimicrobial studies. *3 Biotech. 6*: 132.

Newell, S., Arsuffi, T., and Fallon, R.1988. Fundamental procedures for determining ergosterol content of decaying plant material by liquid chromatography. *Appl. Environ. Microbiol. 54(7)*:1876–1879.

Newmark, H.L. 1999. Squalene, olive oil and cancer risk, Review and hypothesis. *Ann. N.Y. Acad. Sci. 889*: 193-203.

Newsham, K., Upson, R. and Read, D. 2009. Mycorrhizas and dark septate root endophytes in polar regions. *Fungal Ecology. 2*:10–20

Ngosong, C., Gabriel, E., Ruesse, L. 2012. Use of the Signature Fatty Acid 16:1 ω 5 as a Tool to Determine the Distribution of Arbuscular Mycorrhizal Fungi in Soil. *Journal of Lipids. 12* : 1-8.

Noemi, C.B., Nágila, T.A.C., Dinalva, A.M. and Everlon, C.R. 2018. First report of *Aspergillus sydowii* and *Aspergillus brasiliensis* as phosphorus solubilizers in maize. *Annals of Microbiology. 68*:863–870

Nouaim, R. et Chaussod, R.1994. L'arganier, le flamboyant. *Bultin liaison réseau arbres tropicaux. Pp 3-8*

Nouaim, R., Chaussod, R., Mangin, G. and Massillon, P., 1991. L'arganier, système racinaire et microflore. *Colloque : Ligneux des zones arides. Nancy*

Oehl, F., Sieverding, E. and Palenzuela, J. 2011. Advances in *Glomeromycota* taxonomy and classification. *IMA Fungus. 2*: 191–199.

Olsson, P. A. 1999. Signature fatty acids provide tools for determination of the distribution and interactions of mycorrhizal fungi in soil. *FEMS Microbiology Ecology. 29(4)*: 303–310.

Olsson, P. A., Francis, R. Read, D. J., Soderstr B. 1998. Growth of arbuscular mycorrhizal mycelium in calcareous dune sand and its interaction with other soil microorganisms as estimated by measurement of specific fatty acids. *Plant and Soil*. 201(1): 9–16.

Orchard, S., Hilton, S., Bending, G.D., Dickie, I., Standish, R., Gleeson, D., Jeffery, R., Powell, J., Walker, C., Bass, D., Monk, J., Simonin, A. and Ryan, M. 2017. Fine endophytes (*Glomus tenue*) are related to Mucoromycotina, not Glomeromycota. *New Phytologist*. 213:481–486

Ottmani, N. 1995. Etude sur l'arganier et lutte contre la désertification. Actes de journées d'études sur l'Arganier. Essaouira, 29-30 Septembre 1995

Ouallal, I., Abbas, Y., Ech-cheddadi, S., Ouajdi, M., Ouhadach, M., El Yacoubi, H., Benaissa, K, El Goumi, Y. et Rochdi, A. 2018. Diversité des champignons endomycorhiziens de l'arganier et potentiel mycorrhizogène des sols rhizosphériques des arganeraies du Sud-Ouest marocain. *Bois et Forêts des Tropiques*. 338:73-86.

Ould Mohamedou, M.M., Tacha, A., El Messal, M., El Kebbaj, M.S., Chraibi, A. and Adlouni, A. 2011a. The consumption of argan oil induces a lipid-lowering effect in dyslipidemic patients. *Mediterr J Nutr Metab*. 11: 80- 89.

Ould Mohamedou, M.M., Zouirech, K., El Messal, M., Elkebbaj, M. S., Chraibi, A. And Adlouni, A., 2011b. Argan Oil Exerts an Antiatherogenic Effect by Improving Lipids and Susceptibility of LDL to Oxidation in Type 2 Diabetes Patients. *International Journal of Endocrinology*. 2011: 1-8.

Ould Safi, M. 2014 . Caractérisation et état sanitaire de l'arganeraie de Tindouf. Mémoire de magister. université de Telemcen. 62P.

Pansu, M., Gautheyrou, J. 2003, Handbook of Soil Analysis Mineralogical, Organic and Inorganic Methods Library of Congress Control Number. Springer Berlin Heidelberg. 993p.

Pavithra, G., Sumant, B., Meenakshi, R. and Seweta, S. 2020. Role of Endophytic Microbes Against Plant Pathogens: A Review. *Asian Journal of Plant Sciences*. 19: 54-62.

Perotto, S., Girlanda, M. and Martino, E. 2002. Ericoid mycorrhizal fungi: some new perspectives on old acquaintances. *Plant and Soil*. 244:41–53

Perru, O. 2006. Symbiose et modélisation en biologie, un point de vue épistémologique. Conférence francophone sur la modélisation en biologie et en médecine. Craiova, Roumanie, 2006.

Pétard, J. 1993. Soil analysis: Methods of analysis. Nouméa, French: ORSTOM, 192p.

Peuk, A.D. 2000. The chemical composition of xylensapin *Vitis vinifera* L. cv. Riesling during vegetative growth on three different francian vineyard soils and as influenced by nitrogen fertilizer. *Am. Enol. Viticult.* 51 :329-339

Philips, J.M. and Hayman, D.S. 1970. Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. *Trans. Brit. Mycol. Soc.* 55:158-161 (1970).

Pickles, B. J., Genney, D. R., Anderson, I. C. and Alexander, I. J. 2012. Spatial analysis of ectomycorrhizal fungi reveals that root tip communities are structured by competitive interactions. *Mol Ecol.* 21(20): 5110-5123.

Pimm, S.L., Jones, H.L., and Diamond, J. 1988. On the risk of extinction. *The American Naturalist.* 132(6): 757–785.

Plenchette, C. Clermont-Dauphin, C. Meynard, J. M. and Fortin, J. A. 2005. Managing arbuscular mycorrhizal fungi in cropping systems. *Canadian Journal of Plant Science.* 85(1): 31-40.

Porras-Alfaro, A. and Bayman, P. 2009. Hidden Fungi, Emergent Properties: Endophytes and Microbiomes. *Annual Review of Phytopathology.* 49(1):291-315.

Porras-Alfaro, A. and Bayman, P., 2011. Hidden fungi, emergent properties: endophytes and microbiomes. *Annu. Rev. Phytopathol.* 23: 291-315.

Porras-Alfaro, A., Herrera, J., Sinsabaugh, R. L., Odenbach, K. J., Lowrey, T. and Natvig, D. O. 2008. Novel root fungal consortium associated with a dominant desert grass. *Appl Environ Microbiol.* 74(9): 2805-2813.

Postma, J., Olsson, P. A., and Falkengren-Grerup, U. 2007. Root colonisation by arbuscular mycorrhizal, fine endophytic and dark septate fungi across a pH gradient in acid beech forests. *Soil Biology & Biochemistry.* 39(2): 400-408.

Pozo, M., López-Ráez, J., Azcón-Aguilar, C. and García-Garrido, J. 2015. Phytohormones as integrators of environmental signals in the regulation of mycorrhizal symbioses. *New Phytol.* 205: 1431-1436.

Puttsepp, U., Rosling, A. and Taylor A.F.S. 2004. Ectomycorrhizal fungal communities associated with *Salix viminalis* L. and *S. dasyclados* Wimm. Clones in a shortrotation forestry plantation. *Forest Ecology and Management.* 196: 413–424.

Radi, N. 2003. L'Arganier arbre de Sud-ouest Marocain, en péril à protéger. Thèse de docteur en pharmacie, université NANTES. 96 p

Radi, M., Hamdali, H., Meddich, A., Ouahmane, L. and Hafidi, M. 2014. Le potentiel mycorrhizogène des sols urbains en zones semi-arides et la tolérance du Palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.) au déficit hydrique J. Mater. Environ. Sci. 5 : 1957-1967.

Rahmani, M. 2005. Composition Chimique de L'huile d'argane Vierge. Cahier Agricultures.9 (5): 461-465.

Rammal, H., Bouayed, J. Younos, C. et Soulimani, R. 2009. Notes ethnobotanique et phytopharmacologique d'*Argania spinosa* L. phytothérapie. 7 : 157-160.

Rammal, H., Bouayed, J., Younos, C., et Soulimani, R. 2009. Notes ethnobotanique et phytopharmacologique d'*Argania spinosa* L. phytothérapie. 7 : 157-160.

Rayment, G.E. and Higginson, F.R. 1992. Australian Laboratory Handbook of Soil and Water Chemical Methods. Melbourne. Inkata Press 3. 300p

Read, D.J, Leake, J.R. and Perez-Moreno, J. 2004. Mycorrhizal fungi as drivers of ecosystem processes in heathland and boreal forest biomes. Canadian Journal of Botany. 82:1243–1263.

Rebbas, K., Bounar, R., Gharzouli, R.R., Amdani, M., Djellouli, Y., and Alatou, D. 2012. Plantes d'intérêt médicinale et écologique dans la région d'Ouanougha (M'sila, Algérie). Phytothérapie. 10(2): 131–142.

Redecker, D and Raab, P. 2006. Phylogeny of the Glomeromycota (arbuscular mycorrhizal fungi): recent developments and new gene markers. Mycologia. 98: 885–95

Redecker, D., Morton, J.B. and Bruns, T.D. 2000. Molecular phylogeny of the arbuscular mycorrhizal fungi *Glomus sinuosum* and *Sclerocystis coremioides*. Mycologia 92, 282–285

Références bibliographiques

Richer, A., Feller, C., Jamagne, M. et Arrouays, D. 2008. Perdus dans le triangle des textures étude et Gestion des Sols. 15(2): 97 -111

Rivera-Becerril, F., van Tuinen, D., Martin-Laurent, F., Metwally, A., Dietz, K. J., Gianinazzi, S. and Gianinazzi-Pearson, V. 2005. Molecular changes in *Pisum sativum* L. roots during arbuscular mycorrhiza buffering of cadmium stress. Mycorrhiza. 16(1): 51–60.

- Robertson, D.C., and Robertson, J.A. 1982.** Ultrastructure of *Pterospora andromedea* Nuttall and *Sarcodes sanguinea* Torrey mycorrhizas. *New Phytol.* 92: 539–551
- Rodriguez, R. and White, J. 2009.** Fungal endophytes: diversity and functional roles. *New Phytologist.* 182:314–330
- Romagny, B. et Gyuon, M. 2010.** Des souks aux marchés internationaux-La valorisation économique de l'huile d'argan marocaine : un cas d'école des contradictions du développement durable-. colloque "localiser les produits". 16p.
- Rosario, H., and Benito, B. 2019.** The Role of Soil Fungi in K⁺ Plant Nutrition: Review. *International Journal of Molecular Sciences.* 20: 3169.
- Rouiller, J., Souchier, B., Bruckert, S., Feller, C., Toutain, F. 1994.** Methodes d'analyses des sols. Pp619-652 dans M. Bonneau et B. Souchier, eds. *Pédologie* 2. Constituants et propriétés du sol. Masson, Paris, France'
- Roy-Bolduc, A., Laliberte, E., and Hijri, M. 2016.** High richness of ectomycorrhizal fungi and low host specificity in a coastal sand dune ecosystem revealed by network analysis. *Ecol Evol.* 6(1): 349-362.
- Ruark, G. H. and Zarnoch, S. J. 1992.** Soil carbon, nitrogen and fine root biomass sampling in a pine stand. *Soil Sc. Soc. Am.J.* 56 :1945-1950.
- Rypien, K.L. and Andras, J.P. 2008.** Isolation and characterization of microsatellite loci in *Aspergillus sydowii*, a pathogen of Caribbean Sea fan corals. *Mol Ecol Resour.* 8:230–23
- Rypien, K.L., Andras, J.P. and Harvell, C.D. 2008.** Globally panmictic population structure in the opportunistic fungal pathogen *Aspergillus sydowii*. *Mol Ecol.* 17(18):4068-78
- Safinah, S. H. and Tri W. Y. 2019.** The Use of Fungal Endophyte *Penicillium citrinum* on Tree Seedling: Applicability and Limitation. *BIO Web of Conferences* 20. 03005.
- Safinah, S., Tri, W., Dony, R., Purwanto B., Adnan, A., Dewi A. 2019.** Viability of *Penicillium Citrinum* on Different Carrier Media as Organic Fertilizer. *Journal WASIAN.* 6 (2):69-76
- Saif, S.R. 1981.** The influence of soil aeration on the efficiency of vesicular-arbuscular mycorrhiza. Effect of soil oxygen on the growth and mineral uptake of *Eupatorium odoratum* L. inoculated with *Glomus macrocarpus*. *New Phytologist.* 88: 649-659.

- Saif, S.R. 1981.** The influence of stage of root development on vesicular–arbuscular endogonaceous spore population in field-grown vegetable crops. Summer-grown crops. *New Phytol.* 79:341-348.
- Saleem, M., Murtaza, I., Witkowsky, O., Kohl, A.M. and Aaddodi, N. 2009.** Lupeol triterpene, a novel diet-based microtubule targeting agent: disrupts survivin/cFLIP activation in prostate cancer cells. *Biochemical and Biophysical Research Communication.* 388(3) :576-582.
- Samson, R.A., Houbraken, J. and Thrane U. 2010.** *Food and Indoor Fungi*
- Sanchez-Bel, P., Troncho, P., Gamir, J., Pozo, M., Camañes, G., Cerezo, M. and Flors V. 2016.** The nitrogen availability interferes with mycorrhiza-induced resistance against *Botrytis cinerea* in tomato. *Frontiers in Microbiology.* 7: 1598.
- Sánchez-Castro, I., Ferrol, N., Cornejo, P. et al. 2012.** Temporal dynamics of arbuscular mycorrhizal fungi colonizing roots of representative shrub species in a semi-arid Mediterranean ecosystem. *Mycorrhiza* 22, 449–460.
- Sancholle, M. and Dalpé, Y. 1993.** Taxonomic relevance of fatty acids of arbuscular mycorrhizal fungi and related species. *Mycotaxon* 49:187–193
- Sapp, J. 1994.** *Evolution by association: a history of symbiosis.* New York: Oxford University Press.
- Sapp, J., Carrapico, F. and Zolotonodov, M. 2002.** Symbiogenesis: the hidden face of Constantin Merezhkowsky. *History and Philosophy of the Life Sciences* 24:421–449.
- Saunders, M., Glenn, A. E. and Kohn, L. M. 2010.** Exploring the evolutionary ecology of fungal endophytes in agricultural systems: using functional traits to reveal mechanisms in community processes. *Evol Appl.* 3(5-6): 525-537.
- Schenck, N.C. and Perez, Y. 1987.** *Manual for the Identification of VA Mycorrhizal Fungi.* Synergetic Publication. Gainesville. USA. 59-68
- Schüßler, A. and Walker C. 2010.** *The Glomeromycota: a species list with new families and new genera.* Edinburgh & Kew: The Royal Botanic Garden Munich, Germany: Botanische Staatssammlung Munich; Oregon: Oregon State University

Schussler, A. and Walker C. 2010. The Glomeromycota: a species list with new families and new genera. Edinburgh & Kew: The Royal Botanic Garden Munich, Germany: Botanische Staatssammlung Munich.Oregon. Oregon State University.

Schüßler, A., Schwarzott, D. and Walker C. 2001. A new fungal phylum, the Glomeromycota: phylogeny and evolution* *Dedicated to Manfred Kluge (Technische Universität Darmstadt) on the occasion of his retirement. *Mycological Research*.105(12): 1413-1421.

Seham, S., El-hawary,A., Abeer, S. Moawad, B., Hebatallah, S., Bahr, C., Usama, R.A. and Rabab, M. 2020. Natural product diversity from the endophytic fungi of the genus *Aspergillus* RSC *Advances*. 10: 22058–22079

Sellal, Z.,Ouazzani-Touhami, A., Mouden, N., Ouarraqi, M., Selmaoui, K., Dahmani, J., Benkirane, R. and El Modafar Ch. 2017. Effect of an Endomycorrhizal Inoculum on the Growth of argan tree. *International Journal of Environment Agriculture and Biotechnology*. 2(2):928-939.

Selosse, M.A., Richard, F., He, X. and Simard, S. 2006. Mycorrhizal networks: des liaisons dangereuses? *Trends Ecol Evol* 21:621–628

Simon, L., Lalonde, M. and Bruns, T.D. 1992.Specific amplification of 18S fungal ribosomal genes from vesicular-arbuscular endomycorrhizal fungi colonizing roots. *Appl Environ Microbiol*. 58: 291–295

Singh, P., Sharma, A., Bordoloi, M. and Nandi, S.P. 2020. Molecular Identification of Endophytic Fungi Isolated from Medicinal Plant. *Biointerface Research in Applied Chemistry*. 10 (5): 6436 – 6443.

Singh, R. , Tripathi, R., Ranjan, A. and Srivastava, A. 2020. Fungi as potential candidates for bioremediation, Abatement of Environmental Pollutants. Elsevier. Chapter 9. . 177-191.

Smith, C.K., Coyea, M.R. and Munson, A.D. 2000 . Soil carbon, nitrogen and phosphorus stocks and dynamics under disturbed black spruce forest. *Ecol. App*. 10 :75-78.

Smith, S. E. and Read, D. 2008 a. The symbionts forming arbuscular mycorrhizas. *Mycorrhizal Symbiosis* . 3rd Edition. Academic Press. . London. pp. 13-41..

Smith, S. E. and Read, D. 2008 b. *Mycorrhizal symbiosis*. 4th Edition. Academic Press. San Diego.

Smith, S.E. and Gianinazzi-Pearson, V.1988. Physiological Interactions Between Symbionts in Vesicular-Arbuscular Mycorrhizal Plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*. 39(1): 221-244

Song, Z., Vail, A., Sadowsky, M.J. and Schilling, J.S. 2015. Influence of hyphal inoculum potential on the competitive success of fungi colonizing wood. *Microbial Ecology*. 69: 758–767.

Spatafora, J., Aime, M., Grigoriev, I., Martin, F., Stajich, J. and Blackwell, M.2017. The fungal tree of life: from molecular systematics to genome-scale phylogenies. *Microbiol Spectr*. 5:-0053-2016

Stein, R. A. and Bulboacă, A. E. 2017. Mycotoxins. In Dodd, Ch., Aldsworth, T., Stein, R. A., Cliver, D., Riemann, H. *Foodborne Diseases*. 3rd ed. Elsevier, Academic Press. London. 407-446.

Stein, R.A. and Bulboacă, A.E. 2017. Mycotoxins. In: Dodd, Ch., Aldsworth, T., Stein, R.A., Cliver, D., Riemann, H. (Eds.), *Foodborne Diseases*, 3rd ed. Elsevier, Academic Press. London. 407–446

Strobel, G., E. Ford, J. Worapong, J.K. Harper and A.M. 2002. Isopestacin, an isobenzofuranone from *Pestalotiopsis microspora*, possessing antifungal and antioxidant activities. *Phytochemistry*. 60: 179-183

Stürmer, S.L., Stürmer, R. and Pasqualini, D. 2013. Taxonomic diversity and community structure of arbuscular mycorrhizal fungi (Phylum Glomeromycota) in three maritime sand dunes in Santa Catarina state, south Brazil. *Fungal Eco*. 6(1):27–36

Stussi, I., Henry, F., Moser, P., Danoux, L., Jeanmaire, C., Gillon, V., Benoit, I., Charrouf, Z. And Pauly, G., 2005. *Argania spinosa* –How Ecological Farming, Fair Trade and Sustainability Can Drive the Research for New Cosmetic Active Ingredients. *SOFW journal*. 10 : 35-46

Subler, S., Kirsh, K.S. 1998. Spring dynamic of soil carbon, nitrogen and microbial activity in earth warm middens in no-till cornfield. *Bio. Fert. Soils*. 26 :243-249

Suryanarayanan, T.S., Venkatesan, G. and Murali, T.S. 2003. Endophytic fungal communities in leaves of tropical forest trees: diversity and distribution patterns. *Curr. Sci*. 85: 489–493.

Sýkorová, Z., Ineichen, K. and Wiemken, A. 2007. The cultivation bias: different communities of arbuscular mycorrhizal fungi detected in roots from the field, from bait plants transplanted to the field, and from a greenhouse trap experiment. *Mycorrhiza*. 18: 1–14.

Sýkorová, Z., Wiemken, A and Redecker, D. 2007. Co-occurring *Gentiana verna* and *Gentiana acaulis* and their neighboring plants in two Swiss upper montane meadows harbor distinct arbuscular mycorrhizal fungal communities. *Appl Environ Microbiol*. 73:5426–5434

Sylvia, D.M. and Williams, S.E. 1992. Vesicular-arbuscular mycorrhizae and environmental stress . Lindermann R G, eds, Mycorrhizae in Sustainable Agriculture. American Society of Agronomy. Madison. pp. 101-124.

Taieb brahimi A., 2005. Etude cytogénétique de deux populations L'Arganier (*Argania spinosa* (L) Skeels présentes en Algérie. Thèse de magister université des sciences et de la technologie d'Oran : MOHAMED BOUDIAF USTO. 82 p

TARRIER, M. Et Benzyane, M. 2003. L'arganeraie marocaine se meurt : problématique et biodivulsiion. Séchresse. 14 : 60- 62

Tedersoo, L. 2014. Global diversity and geography of soil fungi. Science. 346: 1078.

Tedersoo, L., Pellet, P., Koljalg, U. and Selosse, M. 2007. A Parallel evolutionary path to mycoheterotrophy in understorey Ericaceae and Orchidaceae: ecological evidence for mixotrophy in Pyroleae. Oecologia. 151:206–217

Terfas, M.N. 1997. Arganier (argan en amazigh), thèse pour l'obtention de doctorat d'état. Université de Dakar. Sénégal. 120p.

Trépanier, M., Bécart, G., Moutoglis, P., Willemot, C., Gagné, S., Avis, T.J. and Rioux, J.A. 2005. Dependence of arbuscular mycorrhizal fungi on their plant host for palmitic acid synthesis. Applied and Environmental Microbiology. 71: 5341-5347.

Treseder, K. K. 2004. A meta-analysis of mycorrhizal responses to nitrogen, phosphorus, and atmospheric CO₂ in field studies. New Phytologist. 164(2): 347-355.

Trevor, E., Yu, J.C, Egger, K.N and Peterson, L.R. 2001. Ectendomycorrhizal associations— characteristics and functions. Mycorrhiza. 11:167–177.

Trouvelot, A., Kough, J.L. and Gianinazzi, V. 1986. Mesure de taux de mycorhization VA d'un système racinaire. Recherche de méthodes d'estimation ayant une signification fonctionnelle. In physiological and genetic aspects of mycorrhizal, V. Gianinazzi-Pearson et S. Gianinazzi. INRA. Paris. Pp.217-221.

Tunlid, A. 1992. Biochemical analysis of biomass, community structure, nutritional status, and metabolic activity of microbial communities in soil. Soil Biochem. 7: 229–262.

- Uchida, K., Mizuno, F., Hirota, K., Tadeka, K., Takeuchi, N. and Ishikawa Y. 1983.** Effect of spinastérol and sitosterol on plasma and liver cholesterol levels and biliary and fecal sterol and bile acide excretion in mice. *Japanes journall of Pharmaology.* 33: 134-142
- Ulrich, W. 2008.** Pairs : a FORTRAN program for studying pair wise species associations in ecological matrices. URL [www. uni. torun. pl/wulrichw](http://www.uni.torun.pl/wulrichw).
- Ulrich, W., Almeida-Neto, M. and Gotelli, N. J. 2009.** A consumer's guide to nestedness analysis. *Oikos.* 118(1): 3-17.
- USDA 1951** - Soil Survey Manual, Collectif,
- Van der Heijden, M., Martin, F., Selosse, M.A. and Sanders, I. 2015.** Mycorrhizal ecology and evolution: the past, the present and the future. *New Phytologist.* 205:1406–1423
- Van der Heijden, M., Dombrowski, N. and Schlaeppi, K. 2017.** Continuum of root–fungal symbioses for plant nutrition. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA.* 114: 11574–11576.
- Varma, A., Singh, A., Sudha, M., Sahay, N., Sharma, J. and Kranner, I. 2001.** *Serendipita indica*: a cultivable mycorrhiza-like endosymbiotic fungus. In: Hock B, ed. *The Mycota IX.* Berlin: Springer-Verlag. 125–150
- Véla, E. and Benhouhou, S. 2007.** Evaluation, d'un nouveau point chaud de biodiversité végétale dans le bassin méditerranéen (Afrique du Nord). *Comptes Rendus Biologies.* 330 (8): 589–605.
- Větrovský, T. and Baldrian, P. 2013.** Analysis of soil fungal communities by amplicon pyrosequencing: current approaches to data analysis and the introduction of the pipeline SEED. *Biology and Fertility of Soils.* 49(8): 1027-1037.
- Vié, J.C., Hilton-Taylor, C., Pollock, C., Ragle, J., Smart, J., Stuart, S.N., and Tong, R. 2009.** The IUCN Red List: A key conservation tool. In: J.C. Vié, C. Hilton Taylor, and S.N. Stuart Eds *Wildlife in a Changing World –An Analysis of the 2008 IUCN Red List of Threatened Species.* Gland: IUCN. 1–14.
- Vierheilig, H., Steinkellner, S., Khaosaad, T. and Garcia-Garrido J.M. 2008.** The biocontrol effect of mycorrhization on soil-borne fungal pathogens and the autoregulation of the AM symbiosis: one mechanism, two effects? In: Varma A. (ed.): *Mycorrhiza: Genetics and Molecular Biology, Eco-Function, Biotechnology, Eco-Physiology, Structure and Systematics.* Springer-Verlag, Heidelberg. 307–320.

Wagg, C., Pautler, M., Massicotte, H. B., and Peterson, R. L. 2008. The co-occurrence of ectomycorrhizal, arbuscular mycorrhizal, and dark septate fungi in seedlings of four members of the Pinaceae. *Mycorrhiza*. 18(2): 103-110.

Walker, C. and Schüßler, A. 2004. Nomenclatural clarifications and new taxa in the Glomeromycota Pacispora. *Mycological Research*, 108(9). 981-982.

Walker, C., Vestberg, M., Demircik, F., Stockinger, H., Saito, M., Sawaki, H., Nishmura, I. and Schüßler, A. 2007. Molecular phylogeny and new taxa in the Archaeosporales (Glomeromycota): *Ambispora fennica* gen. sp. nov., *Ambisporaceae* fam. nov., and emendation of *Archaeospora* and *Archaeosporaceae*. *Mycological Research*. 111: 137-153.

Waller, F., Achatz, B., Baltruschat, H., Fodor, J., Becker, K., Fischer, M., Heier, T., Huckelhoven, R., Neumann, C., von, W.D., Franken, P. and Kogel K.H. 2005. The endophytic fungus *Piriformospora indica* reprograms barley to salt-stress tolerance, disease resistance, and higher yield. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* . 102: 13386-13391.

Wang, F.W., Jiao, R.H., Cheng, A.B., Tan, S.H. and Song, Y.C. 2007. Antimicrobial potentials of endophytic fungi residing in *Quercus variabilis* and brefeldin A obtained from *Cladosporium* sp. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 23: 79-83.

Waterman, R.J., Bidartondo, M.I., Stoffberg, J., Combs, J.K., Gebauer, G., Savolainen, V., Barraclough, T.G. and Pauw, A. 2011. The effects of above- and belowground mutualisms on orchid speciation and coexistence. *American Naturalist*. 177:54–68.

Wehner, J., Powell, J. R., Muller, L. A. H., Caruso, T., Veresoglou, S. D., Hempel, S., . . . van der Heijden, M. 2014. Determinants of root-associated fungal communities within Asteraceae in a semi-arid grassland. *Journal of Ecology*, 102(2): 425-436.

Weiss, M., Sýkorová, Z., Garnica, S., Riess, K., Martos, F., Krause, C., Oberwinkler, F., Bauer, R. and Redecker, D. 2011. Sebaciniales everywhere: previously overlooked ubiquitous fungal endophytes. *PLOS ONE* 6: 67-93

Whipps, J.M., 2004. Prospects and limitations for mycorrhizas in biocontrol of root pathogens. *Can. J. Bot.* 82: 1198-1227

White, T. J., Bruns, T., Lee, S., and Taylor, J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetic. *PCR protocols*. Academic Press. San Diego. 315 p.

Yadav, S., Maurya, S. K., Anand, G., Dwivedi, R., and Yadav, D. 2017. Purification, characterization and retting of *Crotalaria juncea* fibres by an alkaline pectin lyase from *Fusarium oxysporum* MTCC 1755. *3 Biotech*, 7(2): 136.

- Yadav, V., Kumar, M, Deep, D., Kumar, H., Sharma, R., Tripathi, T., Tuteja, N., Saxena, A. and Johri A. 2010.** A phosphate transporter from the root endophytic fungus *Serendipita indica* plays a role in phosphate transport to the host plant. *The Journal of Biological Chemistry*. 285:26532–26544
- Yaghmur, A., Aserin, A., Mizrahi, Y., Nerdand, A. and Garti,N.2001.** Evaluation of argan oil for deep-fat frying. *Lebensm.-Wiss.u.-Technol*. 34: 24-130
- Yahi, N., Vela, E., Benhouhou, S., De Belair, G., and Gharzouli, R. 2012.** Identifying important plants areas (key biodiversity areas for plants) in northern Algeria. *Journal of Threatened Taxa*. 4(8) : 2753–2765.
- Yan, L., Zhu, J., Zhao, X., Shi, J., Jiang, C. and Shao C. 2019.** Beneficial effects of endophytic fungi colonization on plants. *Applied Microbiology and biotechnology*. 103:3327–3340.
- Yanjiao, L., Xiangzhen, Li. and Yongping K. 2020.** Ectomycorrhizal Fungi: Participation in Nutrient Turnover and Community Assembly Pattern in Forest Ecosystems. *Forests*. 11: 1-16
- Yuan, J.P., Wang, J.H., Liu, X., Kuang, H.C. and Zhao, S.Y. 2007.** Simultaneous determination of free ergosterol and ergosteryl esters in *Cordyceps sinensis* by HPLC. *Food Chem* 105:1755–1759.
- Zarrouk, K., Smoughen, S., And Maurin, R.1987.** Etude de la pulpe du fruit de l'arganier (*Argania spinosa*) du Maroc : matière grasse et latex. *Actes Inst Agro Vet Rabat*.7 : 17-22.
- Zhang, T., Jia, R.L., and Yu, L.Y. 2016.** Diversity and distribution of soil fungal communities associated with biological soil crusts in the southeastern Tengger Desert (China) as revealed by 454 pyrosequencing. *Fungal Ecology*. 23: 156-163.
- Zhu, H. H., Yao, Q., Sun, X. T., and Hu, Y. L. 2007.** Colonization, ALP activity and plant growth promotion of native and exotic arbuscular mycorrhizal fungi at low pH. *Soil Biology and Biochemistry*. 39(4): 942-950.
- Ziane N., 2006.** Importances subventions pour le « projet Arganier » pour la sauvegarde d'une grande ressource forestière marocaine. *Le portrait smagigh*.
- Zitouni, F. 2010.** Etude des associations mycorrhiziennes entre quatre espèces de terfèze et diverses plantes cistacées et ligneuses en conditions contrôlées. mémoire de magister. Université d'Oran. 262 p.

Zougari-Elwedi, B., Sanaa, M. et Sahraoui, A. L. 2012. évaluation de l'impact de la mycorhization arbusculaire sur la nutrition minérale des plantules de palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L. var. Deglet Nour). étude Gest. des Sols. 19 (3) : 193–202.

Zuccaro, A., Lahrmann, U. and Langen, G. 2014. Broad compatibility in fungal root symbioses. Current Opinion in Plant Biology? 20:135–145

Zuccaro, A., Lahrmann, U., Guldener, U., Langen, G., Pfiffi, S., Biedenkopf, D., Wong, P., Samans, B., Grimm, C., Basiewicz, M., Murat, C., Martin, F. and Kogel, K. 2011. Endophytic life strategies decoded by genome and transcriptome analyses of the mutualistic root symbiont *Serendipita indica*. PLOS Pathogens. 7: 10-22.

Annexe 1

1. Etapes de l'extraction de l'ADN à partir des spores des CMA et du mycélium fongique en utilisant le Kit DNeasy Plant (Qiagen)

1. Détruisez les échantillons (environ 50 spores de CMA) à l'aide de la solution tissulyser II et d'un mortier et d'un pilon (mettre directement environ 200 mg du mycélium dans un tube Ependorff contenant 700 µl de la solution tissulyser et mélanger par vortex pendant 10min.

2. Ajouter 400 µl de tampon AP1 et 4 µl de RNase A. Vortex et incuber pendant 10 min à 65 ° C. Inversez le tube 2 à 3 fois pendant l'incubation.

Remarque: Ne mélangez pas le tampon AP1 et la RNase A avant utilisation.

3. Ajoutez 130 µl de tampon P3. Mélanger et incuber 5 minutes sur de la glace.

4. Recommandé: Centrifuger le lysat pendant 5 min à 20 000 x g (14 000 tr / min).

5. Pipeter le lysat dans une colonne de centrifugation QIAshredder placée dans un tube de collecte de 2 ml.

Centrifuger pendant 2 min à 20000 x g

6. Transférer le filtrat dans un nouveau tube sans déranger le culot s'il est présent. Ajouter 1,5 volume de tampon AW1 et mélanger par pipetage.

7. Transférer 650 µl du mélange dans une colonne de centrifugation DNeasy Mini placée dans un tube collecteur de 2 ml. Centrifuger pendant 1 min à ≥ 6000 x g (≥ 8000 rpm). Jeter l'écoulement. Répétez cette étape avec l'échantillon restant.

8. Placer la colonne de centrifugation dans un nouveau tube de collecte de 2 ml. Ajouter 500 µl de tampon AW2 et centrifuger pendant 1 min à ≥ 6000 x g. Jeter l'écoulement.

9. Ajoutez encore 500 µl de tampon AW2. Centrifuger pendant 2 min à 20 000 x g.

Remarque: Retirez la colonne de centrifugation du tube de collecte avec précaution afin que la colonne n'entre pas en contact avec le filtrat.

10. Transférer la colonne de centrifugation dans un nouveau tube à microcentrifugeuse de 1,5 ml ou 2 ml.

11. Ajouter 100 µl de tampon AE pour l'élution. Incuber pendant 5 min à température ambiante (15–25 ° C).

Centrifuger pendant 1 min à ≥ 6000 x g.

2. Etapes de purification d'ADN à partir du produit PCR en utilisant QIAquick® PCR

Purification Kit

1. Ajouter 5 volumes de tampon PB à 1 volume de la réaction de PCR et mélanger. Si la couleur du mélange est orange ou violette, ajoutez 10 µl d'acétate de sodium 3 M, pH 5,0, et mélangez. La couleur du mélange deviendra jaune.

2. Placer une colonne QIAquick dans un tube collecteur de 2 ml fourni ou dans un collecteur à vide.

3. Pour lier l'ADN, appliquer l'échantillon sur la colonne QIAquick et centrifuger pendant 30 à 60 s jusqu'à ce que tous les échantillons soient passés à travers la colonne.

Jeter le filtrat et replacer la colonne QIAquick dans le même tube.

4. Pour laver, ajouter 750 µl de tampon PE dans la centrifugeuse à colonne QIAquick pendant 30 à 60 s

Jeter le filtrat et replacer la colonne QIAquick dans le même tube.

5. Centrifuger à nouveau la colonne QIAquick dans le tube de prélèvement de 2 ml fourni pendant 1 min pour éliminer le tampon de lavage résiduel.

6. Placer chaque colonne QIAquick dans un tube à microcentrifugeuse propre de 1,5 ml.


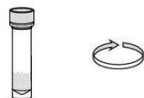


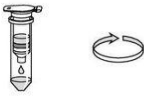
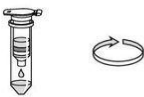


7. Pour éluer l'ADN, ajoutez 50 µl de tampon EB (Tris · Cl 10 mM, pH 8,5) ou de l'eau (pH 7,0–8,5) au centre de la membrane QIAquick et centrifuger la colonne pendant 1 min. Pour augmenter la concentration d'ADN, ajouter 30 µl de tampon d'élution au centre de la membrane QIAquick, laisser reposer la colonne pendant 1 min, puis centrifuger.

3. Protocol d'extraction d'AND génomique à partir des racines d'Arganier

Genomic DNA from soil

Protocol-at-a-glance (Rev.05)

NucleoSpin® Soil

1	Prepare sample		NucleoSpin® Bead Tube Type A 250–500 mg sample material 700 µL SL1 or SL2												
2	Adjust lysis conditions		150 µL Enhancer SX												
3	Sample lysis		Horizontally vortex 5 min at RT or use other homogenizers according to manufacturers protocol												
4	Precipitate contaminants		11,000 x g, 2 min 150 µL SL3 Vortex 5 s 0–4 °C, 5 min 11,000 x g, 1 min												
5	Filter lysate		Load supernatant on NucleoSpin® Inhibitor Removal Column (red ring) 11,000 x g, 1 min												
6	Adjust binding conditions		250 µL SB Vortex 5 s												
7	Bind DNA		Load 550 µL sample on NucleoSpin® Soil Column (green ring) 11,000 x g, 1 min Load remaining sample 11,000 x g, 1 min												
8	Wash silica membrane		<table border="0"> <tbody> <tr> <td>1st</td> <td>500 µL SB</td> <td>11,000 x g, 30 s</td> </tr> <tr> <td>2nd</td> <td>550 µL SW1</td> <td>11,000 x g, 30 s</td> </tr> <tr> <td>3rd</td> <td>700 µL SW2 Vortex 2 s</td> <td>11,000 x g, 30 s</td> </tr> <tr> <td>4th</td> <td>700 µL SW2 Vortex 2 s</td> <td>11,000 x g, 30 s</td> </tr> </tbody> </table>	1st	500 µL SB	11,000 x g, 30 s	2nd	550 µL SW1	11,000 x g, 30 s	3rd	700 µL SW2 Vortex 2 s	11,000 x g, 30 s	4th	700 µL SW2 Vortex 2 s	11,000 x g, 30 s
1st	500 µL SB	11,000 x g, 30 s													
2nd	550 µL SW1	11,000 x g, 30 s													
3rd	700 µL SW2 Vortex 2 s	11,000 x g, 30 s													
4th	700 µL SW2 Vortex 2 s	11,000 x g, 30 s													
9	Dry silica membrane		11,000 x g, 2 min												
10	Elute DNA		30–100 µL SE RT, 1 min 11,000 x g, 30 s												

Annexe 2 : analyses statistiques

Analyse de la variance (pH) :

Source	DDL	Somme des carrés	Moyenne des carrés	F	Pr > F
Modèle	2	1,574	0,787	19,390	0,002
Erreur	6	0,244	0,041		
Total corrigé	8	1,818			

Analyse de la variance (CEC) :

Source	DDL	Somme des carrés	Moyenne des carrés	F	Pr > F
Modèle	2	0,020	0,010	33,037	0,001
Erreur	6	0,002	0,000		
Total corrigé	8	0,022			

Analyse de la variance (C) :

Source	DDL	Somme des carrés	Moyenne des carrés	F	Pr > F
Modèle	2	9,031	4,516	390,785	<0,0001
Erreur	6	0,069	0,012		
Total corrigé	8	9,101			

Analyse de la variance (MO) :

Source	DDL	Somme des carrés	Moyenne des carrés	F	Pr > F
Modèle	2	26,851	13,425	393,504	<0,0001
Erreur	6	0,205	0,034		
Total corrigé	8	27,055			

Analyse de la variance (Azote) :

Annexe 2

Source	DDL	Somme des carrés	Moyenne des carrés	F	Pr > F
Modèle	2	69625,149	34812,574	118,552	<0,0001
Erreur	6	1761,887	293,648		
Total corrigé	8	71387,036			

Analyse de la variance (P assimilabe) :

Source	DDL	Somme des carrés	Moyenne des carrés	F	Pr > F
Modèle	2	345,001	172,501	885,425	<0,0001
Erreur	6	1,169	0,195		
Total corrigé	8	346,170			

Analyse de la variance (Calcaire total) :

Source	DDL	Somme des carrés	Moyenne des carrés	F	Pr > F
Modèle	2	49,844	24,922	313,969	<0,0001
Erreur	6	0,476	0,079		
Total corrigé	8	50,321			

Matrice de corrélation :

	pH	CEC	C	MO	Azote	P assimilabe	Calcaire total	Fréquence de Mycorhization	Nombre de spores
pH	1	0,917	-0,599	-0,599	-0,510	-0,799	0,877	0,363	-0,526
CEC	0,917	1	-0,614	-0,614	-0,578	-0,833	0,943	0,374	-0,565
-									
C	0,599	-0,614	1	1,000	0,978	0,939	-0,800	-0,900	0,992
-									
MO	0,599	-0,614	1,000	1	0,978	0,939	-0,800	-0,900	0,992
-									
Azote	0,510	-0,578	0,978	0,978	1	0,915	-0,785	-0,898	0,987
-									
P assimilabe	0,799	-0,833	0,939	0,939	0,915	1	-0,956	-0,758	0,907
Calcaire total	0,877	0,943	-0,800	-0,800	-0,785	-0,956	1	0,577	-0,757
Fréquence de Mycorhization	0,363	0,374	-0,900	-0,900	-0,898	-0,758	0,577	1	-0,932
-									
Nombre de spores	0,526	-0,565	0,992	0,992	0,987	0,907	-0,757	-0,932	1

Valorisation des travaux de thèse

Publication internationale

Abdallah NOUI, Abdelkader SAADI, Abdul SHAKOOR, Abdelaziz MEROUANE, Nassima MOSTEFA DELLA, Gul ZAIB, Damilare Stephen AKINYEMI, Housseyn MEDJAHED: *Diversity of endophytic fungal community associated to the roots of Argania spinosa (L.) Skeels growing in the arid and semi-arid regions of Algeria*. Acta agriculturae Slovenica 10/**2019**; 114(1):103., DOI:10.14720/aas.2019.114.1.12

Communications internationales

Abdallah Noui, saadi abdelkader, koudri mohamed, medjahed housseyn, merouane abdelaziz: *Diversity of arbuscular mycorrhizal fungi associated to the rhizosphere of argan trees from north-western of Algeria*. The 1st International Conference Microbial Ecology: Towards New Challenges, Setif; 12/**2015**

Abdallah NOUI, Nassima MOSTEFA DELLA, Abdelkader SAADI, Selman ZABEL, Abdelaziz MEROUANE, Housseyn MEDJAHED: *Diversité des champignons mycorhiziens à arbuscules associés à l'arganier du nord-ouest d'Algérie*. 1er Forum Méditerranéen des doctorants et des jeunes chercheurs, CIHEAM-IAM, Montpellier, **07/2016**

Abdallah NOUI, Nassima MOSTEFA DELLA, Abdelkader SAADI, Abdelaziz MEROUANE, Housseyn MEDJAHED: *Arbuscular mycorrhizal fungi associated to the rhizosphere of argan trees from Algeria*. 1^{er} Conférence internationale sur les symbioses végétales et leurs applications biotechnologiques, agronomiques et environnementales, CIHEAM-IAM, Montpellier, **04/2016**

Diversity of endophytic fungal community associated to the roots of *Argania spinosa* (L.) Skeels growing in the arid and semiarid regions of Algeria

Abdallah NOUI^{1,2,3}, Abdelkader SAADI², Abdul SHAKOOR^{4,5}, Abdelaziz MEROUANE^{1,2}, Nassima MOSTEFA DELLA^{1,2}, Gul ZAIB⁶, Damilare Stephen AKINYEMI^{5,7,8}, Housseyn MEDJAHEDI

Received February 11, 2019; accepted September 06, 2019.
Delo je prispelo 11. februarja 2019, sprejeto 06. septembra 2019.

Diversity of endophytic fungal community associated to the roots of *Argania spinosa* (L.) Skeels growing in the arid and semiarid regions of Algeria

Abstract: Current study identified endophytic fungi associated to *Argania spinosa* (argan) roots and revealed diverse haplotype diversity by the sequencing of internal transcribed spacer (ITS). 586 operational taxonomic units were identified and these operational taxonomic units (OTUs) could be assigned to fungal functional diversity such as endophytes, ectomycorrhiza and putative pathogens. Ascomycota phylum was abundant. Beside Ascomycota phylum, Basidiomycota members were also found in argan roots. *Geopora*, *Sebacina*, *Knufia*, *Tomentella*, *Penicillium* had high relative abundance. Our results highlighted a non-nested assemblage of fungi. Current non-nested findings also confirm that fungi have similar pattern found in other habitats. Pairwise analysis mirrored segregation pattern between same and different functional fungal group. Fungi in semi-arid conditions are non-randomly structured. Members of Ascomycota phylum had high Z-scores. This is the first molecular study conducted in arid and semi-arid habitats of Algeria aiming to identify fungi associated with roots in argan tree. Given the fact that deserts are among harsh environments and fungi associated to desert plants may have implications for biodiversity and ecosystem functioning.

Key words: *Argania spinosa*; fungi, diversity; internal transcribed spacer; endophytes; ectomycorrhiza

Raznolikost endofitskih glivnih združb povezanih s koreninami argana (*Argania spinosa* (L.) Skeels), v sušnih in polsušnih območjih Alžirije

Izvleček: Namen raziskave je bil določiti endofitske glive, ki so povezane s koreninami argana (*Argania spinosa*) in odkriti raznolikost različnih haplotipov s sekvenciranjem ITS DNK. Določenih je bilo 586 operacijskih taksonomskih enot in te enote (Operational Taxonomic Unit, OTUs) lahko pripisemo funkcionalni raznolikosti gliv kot so endofiti, ektomikorizne glive in potencialni patogeni. V koreninah argana so bili najbolj pogosti predstavniki zaprtotrošnic (Ascomycota), poleg njih so bili najdeni tudi predstavnikiprostotrošnic (Basidiomycota). Rodovi *Geopora*, *Sebacina*, *Knufia*, *Tomentella*, *Penicillium* so imeli veliko relativno pogostnost. Rezultati raziskave so osvetlili nepovezanost skupin gliv. Podobni vzorci nepovezanih skupin gliv so bili najdeni tudi v drugih habitatih. Analiza parov je pokazala vzorce segregacije med enakimi in različnimi funkcionalnimi skupinami gliv. Glive polsušnih območij niso naključno organizirane. Predstavniki zaprtotrošnic imajo velikokrat normalno porazdelitev. To je prva molekularna raziskava v sušnih in polsušnih habitatih Alžirije, katere namen je bil določiti glive, ki so povezane s koreninami argana. Puščave so med najbolj ekstremnimi okolji in glive, ki so povezane s puščavskimi rastlinami so pomemben del raznolikosti in delovanja teh ekosistemov.

Ključne besede: *Argania spinosa*; glive; raznolikost; ITS; endofiti; ektomikoriza

1 Hassiba Benbouali University of Chlef, Laboratory on Natural bio resources, Algeria

2 Hassiba Benbouali University of Chlef, Faculty of Nature and life sciences, Algeria

3 Corresponding author, e-mail: a.noui@univ-chlef.dz

4 Institute of Botany Chinese, State Key Laboratory of Vegetation and Environmental Change

5 Henan University, Key laboratory of Geospatial Technology for the Middle and Lower Yellow River Regions, China

6 Yangzhou University, Institute of Epigenetics and Epigenomics, China

7 University of Chinese Academy of Sciences

8 Yangzhou University, Institute of Epigenetics and Epigenomics, China

1 INTRODUCTION

Fungi are important component of ecosystem and play pivotal role in ecosystem functioning such as carbon and nutrient cycling (Courty et al., 2010; Treseder, 2004). Among fungi there are diverse functional groups such as mycorrhizal, endophytic and pathogenic fungi. These fungi interact with diverse plant species (Smith & Read, 2008), and such interactions are vital for survival and growth of plant species (Finlay, 2008).

Among harsh ecosystem, desert ecosystems represent one of the challenging habitats for microorganism, as water affects microbial activity, which in turn could play crucial role in ecosystem functioning (Austin et al., 2004; Collins et al., 2008). Argan tree (*Argania spinosa* (L.) Skeels) is a slow growing endemic plant species in distributed in north-west Africa (Díaz-Barradas et al., 2010). This tree species is known for its ecological importance because it creates a favourable microclimate for the development of other plant species and protects soils against erosion. In addition, it plays a socio-economic role in the regions where it grows. Each part of the plant including leaves and fruits are used as source of forage for cattle, whereas timber is widely used for fuel purpose, furthermore argan oils have therapeutic properties to cure scars and serve as an anti-ageing agent (Charrouf & Guillaume, 2009). In Algeria, there is decline in population of argan plant due to ecological and anthropogenic factors including climate change and grazing pressure (Charrouf & Guillaume, 2009; Díaz-Barradas et al., 2010).

Given the drastic effect of climate change and anthropogenic factors, it is important to explore the fungal community of desert plant species, such as argan tree. This plant has strong and deep root system (Kenny & De Zborowski, 2007), which harbours high fungal diversity (Sellal, 2016). Previous focus had been paid to study fungal endophytes in arid and semi-arid habitats. For instance, revealed high colonization of fungal endophytes in semi-arid. Martínez-García et al. (2011) also highlighted impact of shrubs on root associated fungi and highlighted importance of selective pressure in determining root associated fungi.

To our knowledge fungal diversity in arid and semi-arid is rarely explored and understood owing to correct identification and most of the fungal strains are non-cultivable in laboratory conditions and laboratory based culturing method may not capture the real fungal diversity (Zhang et al., 2016). Nonetheless, a development in a high throughput sequencing technology provides an excellent platform to explore below ground functional fungal diversity (Buee et al., 2009; Fortuna Miguel et al., 2010).

Nestedness or species-species interaction networks

describing the interactions between species is important structural ecological property, and nestedness has revealed positive influence on diversity against catastrophic effect. Nestedness has been proposed to assess community assembly which can further push our understanding about community structure and interactions therein (Ulrich et al., 2009).

We hypothesize fungal community may lack nestedness pattern but could show other non-random pattern such as segregation and aggregation. We propose that limited resources, such as water paucity and nutrients availability generate the segregation pattern.

Key objectives of current study were to: I) identify root associated functional endophytic fungal diversity; II) assess how different fungal taxonomic genera are organize in roots? III) find potential fungal OTUs segregation and aggregation pattern.

2 MATERIAL AND METHODS

2.1 STUDY AREAS AND SAMPLING

The study was carried out in three different climatic regions of Algeria: Tindouf, Mostaganem and Chlef. The area of Tindouf is a desert region in the south-west of Algeria (28°29'56.47"N 8°07'09.72"W). Mostaganem (35°48'09.81"N 0°03'59.30"E) and Chlef (36°09'46.95"N 1°20'12.22"E) are situated in the north-west of Algeria (Table1)

At each region, five healthy specimens (20-30 m apart) of *Argania spinosa* were randomly selected. Four replications in cardinal directions of each tree were collected and homogenised to form a single sample in cardinal directions. In each direction the top litter (20-40 cm) was removed to eliminate part of the dry/not decomposed leaf litter, and samples (soils and argan roots) were collected at 0-30 cm depth and pooled. Fine roots were excavated and traced from the originating tree to ensure identity. Samples were kept in plastic bags and stored at 4 °C until processing.

2.2 DNA EXTRACTION FROM ROOTS AND PCR

After roots surface sterilization by soaking in 70 % ethanol (7:3, v/v, 1 min), 3 % sodium hypochlorite (3 min) and 70 % ethanol (7:3, v/v, 1 min) and were then rinsed twice for 1 min in sterile water, genomic DNA was extracted from field roots, using the genomic DNA Kit (Nucleo Spin Soil). The manufacturer's protocol was modified in that 250 mg of roots was ground by hand

Table 1: Sites characteristics

Location	Chlef	Mostaganem	Tindouf
Coordinates	36°09'46.95"N 1°20'12.22"E	35°48'09.81"N 0°03'59.30"E	28°29'56.47"N 8°07'09.72"W
Mean annual temperature	18.6° C	18.3° C	23.4° C
Mean annual precipitation	394 mm	436 mm	30 mm
Altitude	119 m	35 m	537 m
Associated plants			<i>Acacia tortilis</i> Forssk. <i>Acacia raddiana</i> Forssk.
			<i>Anabasis articulata</i> Forssk., <i>Asphodelus</i> sp.
			<i>Aristida pungens</i> Desf., <i>Calotropis procera</i> Aiton
		<i>Sonchus arvensis</i> L.	<i>Chrysocomoides cassini</i> Desf.
		<i>Malva sylvestris</i> L.	<i>Euphorbia guyoniana</i> Boiss. & Reut. <i>Faidherbia albida</i> De-lile, <i>Genista saharae</i> Coss. & Durieu
		<i>Avena sativa</i> L.	
		<i>Echium vulgare</i> L.	
		<i>Hordeum vulgare</i> L.	<i>Helianthemum lippii</i> L.
		<i>Bromus</i> sp.	<i>Moricandia arvensis</i> L.,
		<i>Plantago lanceolata</i> L.	<i>Marrubium deserti</i> Noë
	<i>Oxalis</i> sp.	<i>Antenis coatula</i> L.	<i>Nolletia</i> . <i>Retama monosperma</i> L.
	<i>Olea europea</i> L.	<i>Chrysanthemum</i> sp.	<i>Rhus tripartitus</i> L., <i>Zizyphus lotus</i> Lam., <i>Zilla spinosa</i> L.
		<i>Cenaurea napifolia</i> L.	

with pestle in a mortar containing 700 µl of lysis solution before transfer to Eppendorf tube and incubated at 70 °C for 10 min. To study the effect of DNA dilution on PCR inhibitors, after extraction, DNA was diluted 1:1, 1:10, 1:20 and 1:100 with ultra-pure water, in order to obtain DNA containing less PCR inhibitors. Fungal sequences were amplified using the primers ITS1F-ITS4 (White et al., 1990) to target a complete rDNA ITS region. The PCRs were carried out in a final volume of 25 µl, containing 12.5 µl PPP Master Mix (Top-Bio, Prague, Czech Republic) 1 µl of each primer solution (10 µM), 1 µl of DNA template and 9.5 µl ultra-pure water. The PCR conditions were as follow: initial denaturation at 94 °C for 4 min, followed by 35 cycles of denaturation at 94 °C for 45 s, annealing at 52 °C for 45 s and extension at 72 °C for 1min 30 s, with a final extension at 72 °C for 10 min. All PCR reactions were run in Eppendorf PCR cycler. PCR products were examined on a 1 % (w:v) agarose gel with an ethidium bromide staining in and compared to a 100 bp DNA ladder. PCR products (only DNA diluted 1:20 and 1:100 were used in this step) were purified using QIAquick® PCR purification Kit (Qiagen).

2.3 NESTED PCR

The products of the first PCR were diluted 1:1000 with ultra-pure water and used as template DNA for the second PCR amplification using various combinations between gITS7 (Ihrmark et al., 2012) and ITS4 (White et al., 1990) including Illumina adapters. Each PCR reactions (25 µl) contained 12,5 µl PPP Master Mix (Top-Bio, Prague, Czech Republic) 0.5 µl of each primer solution (10 µM), 1µl of DNA template and 10.5 µl ultra-pure water with the following cyclin conditions: initial denaturation at 94 °C for 4 min, followed by 25 cycles of denaturation at 94 °C for 30 s, annealing at 56 °C for 30 s and extension at 72 °C for 30 s, with a final extension at 72 °C for 10 min. PCR products were examined on a 1 % (w:v) agarose gel with ethidium bromide staining in the presence of 100 bp DNA ladder. PCR products were pooled and purified using QIA quick PCR purification Kit (Qiagen). DNA was quantified with Nano Drop (Thermo Scientific) and pooled before sequencing. Amplicons were sequenced on sequenced on Illumina MiSeq 2×250 bp platform in the laboratory of fungal biology, Institute of

microbiology, The Czech Academy of Sciences, Prague, Czech Republic. Species area curve was generated in PC-ORD version 5 (McCune and Mefford, 2006). Curves were generated based on samples.

2.4 BIOINFORMATICS

Sequencing data was analysed in Seed software (Větrovský & Baldrian, 2013), version 2.0.4. Following parameters were carried out: after rarefying the reads and demultiplexing of the samples based on their unique barcodes, removing low-quality sequences and sequences shorter than 40 bp, ITS sequences were extracted from the sequences, the contigs were chimaera-cleaned/clustered by the Usearch tool, version 8.1.1861, (Edgar & Flyvbjerg, 2015) at the similarity level 97 % and the most abundant sequences were compared while following blast tool version 2.2.26 + (Altschul et al., 2008). Sequencing similarity was matched against the sequences in GenBank database (environmental sequences, metagenomes and unidentified organisms excluded).

2.5 STATISTICAL ANALYSIS

To assess fungal community assemblage in argan plant species we carried out a nestedness analysis based on Nestedness Metric Based On Overlap And Decreasing Fill (NODF metric) (Almeida-Neto et al., 2008) implemented in Aninhado software (Guimaraesjr & Guimaraes, 2006). We used present and absent data to compute NODF metric in Aninhado. Fungal OTUs present and absent data was permuted 1000 times and significance was assessed while following null models in Aninhado

software. NODF values were inferred according to p -values of null models.

To discern pair wise fungal OTUs association in argan plant roots collected from sampling regions, non-random association between fungal OTUs was assessed. In order to remove a rare species bias, relationship between fungi having relative frequency of 7 was calculated. Unclassified/unidentified fungal species were also not kept in pairwise analysis as this can lead to false conclusion on OTU community. Presence/absence matrix was randomized and computed to get C -scores and p -values respectively. Values were inferred while following fixed-fixed null model. All the calculations were carried out in the Pairs software (Ulrich, 2008).

3 RESULTS

3.1 FUNGAL COMMUNITY COMPOSITION

Fungal community was diverse, as 1220 fungal OTUs including singletons were recorded. We removed singletons from our analysis, none the less it resulted in 586 OTUs belonging to 65 different genera. Ten most relatively frequent genera belonged to all three functional groups - endophytic, pathogenic and ectomycorrhizal fungi (Fig.1).

Some genera, such as *Geopora*, *Sebacina*, *Knufia*, *Tomentella* and *Penicillium* had high relative abundance in terms of sequence abundance reads (Fig.2).

Ascomycota was the most abundant phylum in all regions (461 reads) comparing to Basidiomycota (125 reads) ($p = 0.0001$).

The number of reads of OTUs varies between the

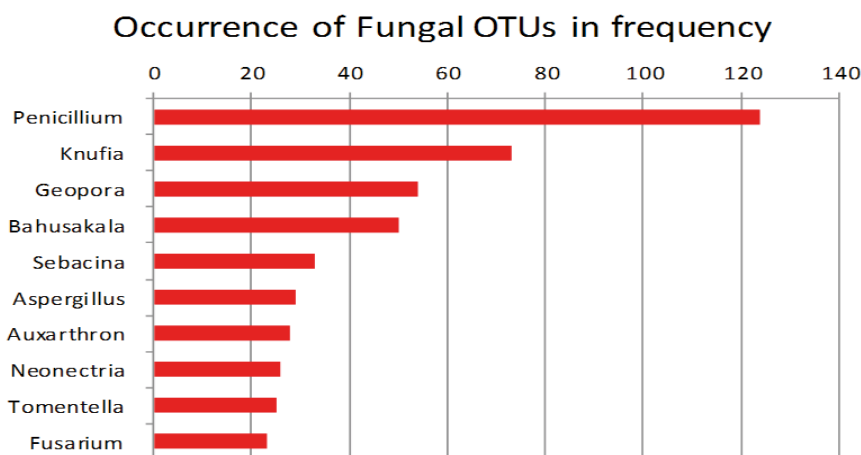


Figure 1: Relative frequency of different functional fungal genus

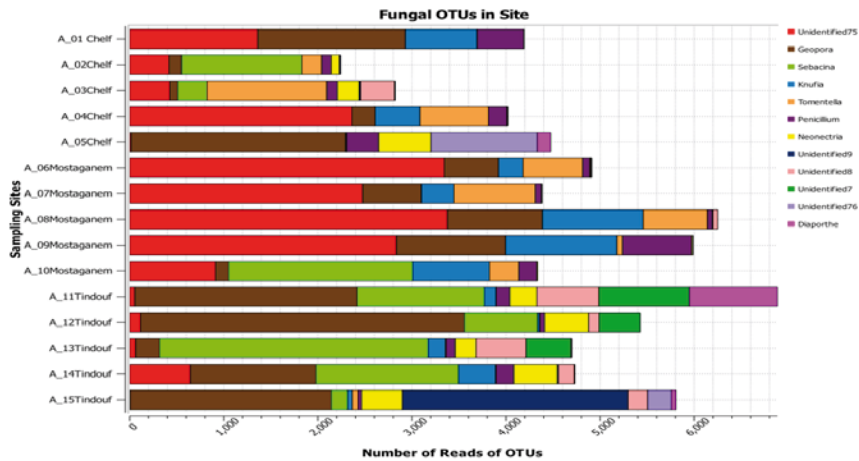


Figure 2: Relative abundance of fungal genus

three regions and from one tree to another in the same region. In fact, Mostaganem was the richest region with fungal community. The genus *Neonectria* was absent in all samples of Mostaganem region. (Figure 2). *Sebacina* was the most abundant genus in Tindouf and absent in all samples of Mostaganem, *Geopora* came in the second position in the same region. However the undefined fungi were the most important fungi in Chlef and Mostaganem ($p = 0.001$).

Sample based curve captured maximum diversity for common fungal OTUs (Fig. 3a), and rarefaction revealed increase in OTU richness, whereas we did not obtain a plateau curve for rare fungal taxa (Figure 3a, Figure 3b).

3.2. FUNGAL COMMUNITY ASSEMBLAGE/NEST-EDNESS ANALYSIS

According to our expectations, we detected low lev-

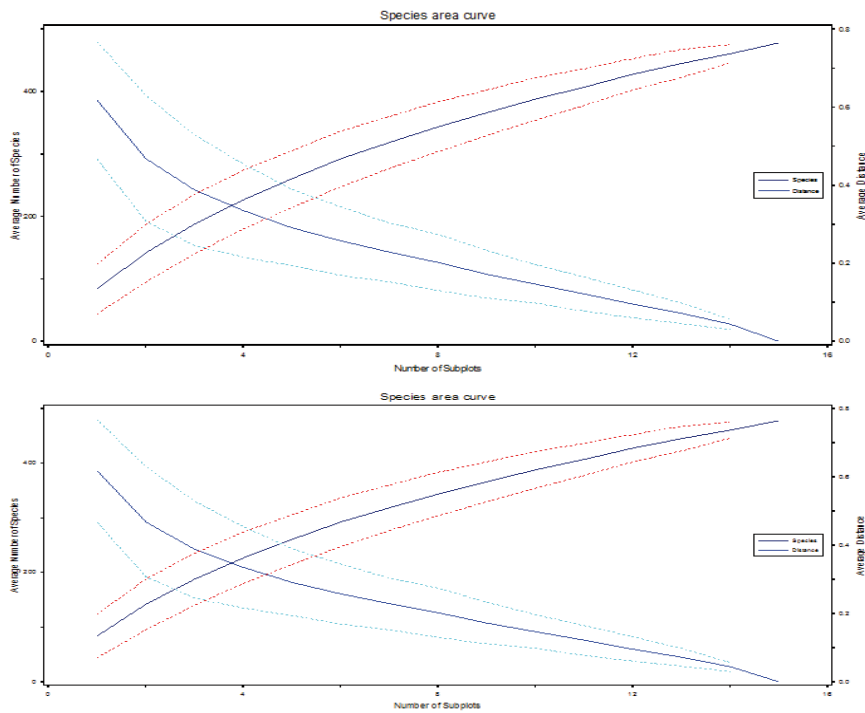


Figure 3a, b: Rarefaction curve for all fungal OTUs. a) Species area curve without singletons. b) Species area curve with singletons. X-axis = number of subplots and Y-axis = OTUs and Sorenson distance of OTUs

Table 2: Species pair results based on Z and P values

Species 1	Species 2	Z -score	P-value
<i>Phomopsis</i> sp.	<i>Tricholoma</i> sp.	4.9	6×10^{-7}
<i>Tricholoma</i> sp.	<i>Pseudogymnoascus</i> sp.	4.9	6×10^{-7}
<i>Knufia</i> sp.4	<i>Phomopsis</i> sp.	4.6	3.5×10^{-6}
<i>Tomentella</i> sp.	<i>Phomopsis</i> sp.	4.5	4.2×10^{-6}
<i>Pseudogymnoascus</i> sp	<i>Bahusakala</i> sp.2	4.4	8.7×10^{-6}
<i>Knufia</i> sp.4	<i>Pseudogymnoascus</i> sp.	3.7	1.4×10^{-4}
<i>Knufia</i> sp.4	<i>Diaporthe</i> sp.	3.7	2.0×10^{-4}
<i>Knufia</i> sp.3	<i>Phomopsis</i> sp.	3.3	8.8×10^{-4}
<i>Tomentella</i> sp.	<i>Pseudogymnoascus</i> sp.	3.1	1.6×10^{-3}
<i>Tricholoma</i> sp.	<i>Embellisia</i> sp.	3.1	1.7×10^{-3}
<i>Pyrenochaeta</i> sp.	<i>Penicillium</i> sp.6	2.9	3.2×10^{-3}
<i>Tricholoma</i> sp.	<i>Diaporthe</i> sp.	2.8	3.8×10^{-3}
<i>Knufia</i> sp.3	<i>Diaporthe</i> sp.	2.8	4.8×10^{-3}
<i>Knufia</i> sp.3	<i>Embellisia</i> sp.	2.7	5.9×10^{-3}
<i>Phomopsis</i> sp.	<i>Pseudogymnoascus</i> sp.	-1.9	4.7×10^{-2}

el of nestedness as revealed by analysis. NODF values for whole fungal community were significantly not higher than expected by chance (NODF = 16, $p = 0.7$).

3.3 GENUS PAIR ANALYSIS

19 species depicted significant non-random association and majority of species showed segregation pattern, while 5 species revealed positive co-occurrence (Table 2). Competitive interactions were predominant at phylum and subphylum level. Positive interactions between the fungi at same and different genera were observed (Table 2).

4 DISCUSSION

Using high throughput sequencing, we explored fungal communities in semi-arid region. Majority of fungal OTUs belonged to Ascomycota phylum. Culturing based study also revealed dominance of Ascomycota fungi in desert covered by *Artemisia herba-alba* Asso and *Zygophyllum dumosum* Boiss. (Grishkan & Nevo, 2010). Current results are also in line with study conducted in semi-arid areas. Based on high throughput sequencing technology (Wehner et al., 2014), highlighted abundance of Ascomycota phylum in semi-arid. Our results support notions that desert plant *Argania spinosa* harbour diverse fungal communities. We reported fungal OTUs

representing different functional diversity such as mycorrhizal, endophytic and pathogens. It is not uncommon to report and document such functional diversity in semi-arid habitat. It has been well documented occurrence of mycorrhizal, endophytic and pathogens diversity in semi-arid (Porrás-Alfaro et al., 2008). We highlighted dominance of Ascomycota phylum and fungal OTUs such as *Penicillium* and *Fusarium*. Indeed, semi-arid supports high endophytic fungal diversity, as strong evidences suggest prevalence and dominance of Ascomycota, *Penicillium* and *Fusarium* (Gonzalez-Teuber et al., 2017) Fungal OTUs i.e. *Geopora* which are identified and characterized in present research could be compared with other habitats, as *Geopora* formed mycorrhizal association with *Pinus* species (Flores-Renteria et al., 2014), and samples collected in dry season revealed dominance of *Geopora* genus fungi (Gordon & Gehring, 2011). This shows adaptability and occurrence of *Geopora* in various environmental conditions argan plant supports high fungal diversity, as Basidiomycota members were also recorded. Usually Basidiomycetes fungi are found in relative moist habitat (Buee et al., 2009), therefore fungal diversity explored could be linked other habitats. Research carried out in secondary temperate forest documented occurrence of endophytic and ectomycorrhizal fungi in single host plant species (Frossard et al., 2015). *Sebacina* genus was among abundant fungal genus detected in argan root samples from Tindouf. There is strong evidence which supports ubiquitous nature of Sebaciales and such emerging evidences indicate ubiquitous occurrence

of fungi in various habitats. Our results did not capture rare fungal diversity (Figure 3b). The plausible explanation for such absence of rare fungal diversity is overexploitation of argan plant species and overexploitation may stem local extinction of rare fungal taxa.

Fungal community depicted non-nested assemblage and on the contrary fungi revealed competitive interactions (Table 2). Current non nested findings also confirm that fungi have similar pattern as compare to fungi in forests. We found support for our hypothesis that fungi may lack nested pattern and it could also lead to conclusion that argan root do not support facilitative interactions. Similar results were documented by some other authors (Bahram et al., 2014; Roy-Bolduc et al., 2016). Since, argan plants are cultivated and thus under human management and grazing pressure (Charrouf & Guillaume, 2009; Díaz-Barradas et al., 2010), we cannot exclude anthropogenic factors causing a non-nested assemblage of fungi. Another explanation is that host plants were under abiotic stress, which in turn may had generated non nested pattern.

Pair wise analysis mirrored segregation pattern between same and different functional fungal group. Several mechanisms are proposed to reveal such non-random occurrence pattern and competitive interactions between fungal OTUs could generate segregation pattern (Chen et al., 2000; Chilvers et al., 1987).

Competitive interactions between fungal OTUs in semi-arid have revealed that fungal communities were non-randomly structured in semi-arid. Our results are in line with (Wehner et al., 2014) who highlighted the abundance of Ascomycota phylum in semi-arid. We also showed that majority of fungal OTUs belonging to Ascomycota phylum had Z- scores -2 above 2 (Table2), showing statistical significance (Ulrich, 2008). Fungal pairs having endophytic and mycorrhizal mode of life style had high Z-scores, which indicated strong signal of competition between them. It is important to mention that previous studies focused on fungal groups and highlighted the prevalence of segregation patterns between ectomycorrhizal and endophytic fungi (Pickles et al., 2012; Saunders et al., 2010).

Positive interactions between same and different fungal OTUs suggested facilitative interactions between fungi. Facilitative interactions between fungi could be due to fact that fungi having similar functional requirements may occupy the same habitat which in turn could result in facilitative interactions. Species may sort according to shared requirements (Leibold et al., 2004), this may generate positive interactions between species. Given the fact, different functional genus in root occur due to different ecological and physiological requirements; henceforth there is high probability of positive interac-

tions between fungi and facilitative interactions are well documented between different functional fungal groups (Wagg et al., 2008).

5 CONCLUSIONS

The present study is the first study to assess fungi associated with *Argania spinosa* roots growing in the arid and semi-arid climate. We revealed non nested assemblage pattern at community level, whereas pair wise association showed non-random pattern. Quite significant numbers of fungal OTUs were explored.

Future studies may carry out abundance-based data to assess pair wise association between fungi. We provide framework and initial study while using present-absent data to reveal non-random association of fungi in argan roots. Furthermore, inoculation experiments may be conducted to confirm facilitative and competitive interactions. Perhaps most striking feature of our research was high fungal diversity associated to single desert plant species.

6 ACKNOWLEDGEMENT

We would like to acknowledge Dr. Jan Jansa for providing the equipment and technical support for experiments involving sequencing. We also thank Professor Ahmed Aichouni, director of the laboratory of natural bio resources for the excellent laboratory facilities

7 REFERENCE

- Austin, A. T., Yahdjian, L., Stark, J. M., Belnap, J., Porporato, A., Norton, U., Schaeffer, S. M. (2004). Water pulses and biogeochemical cycles in arid and semiarid ecosystems. [Research Support, Non-U.S. Gov't] <https://doi.org/10.1007/s00442-004-1519-1>
- Bahram, M., Harend, H., & Tedersoo, L. (2014). Network perspectives of ectomycorrhizal associations. *Fungal Ecology*, 7, 70-77. <https://doi.org/10.1016/j.funeco.2013.10.003>
- Buee, M., Reich, M., Murat, C., Morin, E., Nilsson, R. H., Uroz, S., & Martin, F. (2009). Pyrosequencing analyses of forest soils reveal an unexpectedly high fungal diversity. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *New Phytol*, 184(2), 449-456. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2009.03003.x>
- Charrouf, Z., & Guillaume, D. (2009). Sustainable Development in Northern Africa: The Argan Forest Case. *Sustainability*, 1(4), 1012-1022. <https://doi.org/10.3390/su1041012>
- Collins, S. L., Sinsabaugh, R. L., Crenshaw, C., Green, L., Porras-Alfaro, A., Stursova, M., & Zeglin, L. H. (2008). Pulse dynamics and microbial processes in aridland ecosystems.

- Journal of Ecology, 96(3), 413-420. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2745.2008.01362.x>
- Courty, P.-E., Buée, M., Diedhiou, A. G., Frey-Klett, P., Le Tacon, F., Rineau, F., Garbaye, J. (2010). The role of ectomycorrhizal communities in forest ecosystem processes: New perspectives and emerging concepts. *Soil Biology and Biochemistry*, 42(5), 679-698. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2009.12.006>
- Díaz-Barradas, M. C., Zunzunegui, M., Ain-Lhout, F., Jáuregui, J., Boutaleb, S., Álvarez-Cansino, L., & Esquivias, M. P. (2010). Seasonal physiological responses of *Argania spinosa* tree from Mediterranean to semi-arid climate. *Plant and Soil*, 337(1-2), 217-231. <https://doi.org/10.1007/s11104-010-0518-8>
- Edgar, R. C., & Flyvbjerg, H. (2015). Error filtering, pair assembly and error correction for next-generation sequencing reads. [Evaluation Studies]. *Bioinformatics*, 31(21), 3476-3482. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btv401>
- Finlay, R. D. (2008). Ecological aspects of mycorrhizal symbiosis: with special emphasis on the functional diversity of interactions involving the extraradical mycelium. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. <https://doi.org/10.1093/jxb/ern059>
- Flores-Renteria, L., Lau, M. K., Lamit, L. J., & Gehring, C. A. (2014). An elusive ectomycorrhizal fungus reveals itself: a new species of *Geopora* (Pyronemataceae) associated with *Pinus edulis*. [Research Support, Non-U.S. Gov't] <https://doi.org/10.3852/13-263>
- Fortuna Miguel, A., Stouffer Daniel, B., Olesen Jens, M., Jordano, P., Mouillot, D., Krasnov Boris, R., Bascompte, J. (2010). Nestedness versus modularity in ecological networks: two sides of the same coin? *Journal of Animal Ecology*, 79(4), 811-817. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2656.2010.01688.x>
- Frossard, A., Ramond, J.-B., Seely, M., & Cowan, D. A. (2015). Water regime history drives responses of soil Namib Desert microbial communities to wetting events. *Scientific Reports*, 5, 12263. <https://doi.org/10.1038/srep12263>
- Gonzalez-Teuber, M., Vilo, C., & Bascunan-Godoy, L. (2017). Molecular characterization of endophytic fungi associated with the roots of *Chenopodium quinoa* inhabiting the Atacama Desert, Chile. *Genom Data*, 11, 109-112. <https://doi.org/10.1016/j.gdata.2016.12.015>
- Gordon, G. J., & Gehring, C. A. (2011). Molecular characterization of pezizalean ectomycorrhizas associated with pinyon pine during drought. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. <https://doi.org/10.1007/s00572-010-0349-8>
- Research Support, U.S. Gov't, Non-P.H.S.]. *Mycorrhiza*, 21(5), 431-441. <https://doi.org/10.1007/s00572-010-0349-8>
- Grishkan, I., & Nevo, E. (2010). Spatiotemporal distribution of soil microfungi in the Makhtesh Ramon area, central Negev desert, Israel. *Fungal Ecology*, 3(4), 326-337. <https://doi.org/10.1016/j.funeco.2010.01.003>
- Guimaraesjr, P., & Guimaraes, P. (2006). Improving the analyses of nestedness for large sets of matrices. *Environmental Modelling & Software*, 21(10), 1512-1513. <https://doi.org/10.1016/j.envsoft.2006.04.002>
- Ihrmark, K., Bodeker, I. T., Cruz-Martinez, K., Friberg, H., Kubartova, A., Schenck, J., Lindahl, B. D. (2012). New primers to amplify the fungal ITS2 region--evaluation by 454-sequencing of artificial and natural communities. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *FEMS Microbiol Ecol*, 82(3), 666-677. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2012.01437.x>
- Kenny, L., & De Zborowski, I. (2007). *Atlas de l'arganier et de l'arganeraie*. Rabat, Maroc: IAV Hassan II.
- Leibold, M. A., Holyoak, M., Mouquet, N., Amarasekare, P., Chase, J. M., Hoopes, M. F., . . . Gonzalez, A. (2004). The metacommunity concept: a framework for multi-scale community ecology. *Ecology Letters*, 7(7), 601-613. <https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2004.00608.x>
- Loro, M., Valero-Jiménez, C. A., Nozawa, S., & Márquez, L. M. (2012). Diversity and composition of fungal endophytes in semiarid Northwest Venezuela. *Journal of Arid Environments*, 85, 46-55. <https://doi.org/10.1016/j.jaridenv.2012.04.009>
- Martínez-García, L. B., Armas, C., Miranda, J. d. D., Padilla, F. M., & Pugnaire, F. I. (2011). Shrubs influence arbuscular mycorrhizal fungi communities in a semi-arid environment. *Soil Biology and Biochemistry*, 43(3), 682-689. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2010.12.006>
- Pickles, B. J., Genney, D. R., Anderson, I. C., & Alexander, I. J. (2012). Spatial analysis of ectomycorrhizal fungi reveals that root tip communities are structured by competitive interactions. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Mol Ecol*, 21(20), 5110-5123. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2012.05739.x>
- Porras-Alfaro, A., Herrera, J., Sinsabaugh, R. L., Odenbach, K. J., Lowrey, T., & Natvig, D. O. (2008). Novel root fungal consortium associated with a dominant desert grass. [Research Support, U.S. Gov't, Non-P.H.S.]. *Appl Environ Microbiol*, 74(9), 2805-2813. <https://doi.org/10.1128/AEM.02769-07>
- Roy-Bolduc, A., Laliberte, E., & Hijri, M. (2016). High richness of ectomycorrhizal fungi and low host specificity in a coastal sand dune ecosystem revealed by network analysis. *Ecol Evol*, 6(1), 349-362. <https://doi.org/10.1002/ece3.1881>
- Saunders, M., Glenn, A. E., & Kohn, L. M. (2010). Exploring the evolutionary ecology of fungal endophytes in agricultural systems: using functional traits to reveal mechanisms in community processes. *Evol Appl*, 3(5-6), 525-537. <https://doi.org/10.1111/j.1752-4571.2010.00141.x>
- Sellal, Z. (2016). Arbuscular Mycorrhizal fungi species associated with rhizosphere of *Argania spinosa* (L.) Skeels in Morocco. *International Journal of Pure & Applied Bioscience*, 4(1), 82-99. <https://doi.org/10.18782/2320-7051.2201>
- Smith, S. E., & Read, D. (2008). 1 - The symbionts forming arbuscular mycorrhizas *Mycorrhizal Symbiosis* (Third Edition) (pp. 13-41). London: Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-012370526-6.50003-9>
- Treseder, K. K. (2004). A meta-analysis of mycorrhizal responses to nitrogen, phosphorus, and atmospheric CO₂ in field studies. *New Phytologist*, 164(2), 347-355. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2004.01159.x>
- Ulrich, W. (2008). Pairs - a FORTRAN program for studying pair wise species associations in ecological matrices [8]. Pairs.
- Ulrich, W., Almeida-Neto, M., & Gotelli, N. J. (2009). A consumer's guide to nestedness analysis. *Oikos*, 118(1), 3-17. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0706.2008.17053.x>
- Větrovský, T., & Baldrian, P. (2013). Analysis of soil fungal com-

- munities by amplicon pyrosequencing: current approaches to data analysis and the introduction of the pipeline SEED. *Biology and Fertility of Soils*, 49(8), 1027-1037. <https://doi.org/10.1007/s00374-013-0801-y>
- Wagg, C., Pautler, M., Massicotte, H. B., & Peterson, R. L. (2008). The co-occurrence of ectomycorrhizal, arbuscular mycorrhizal, and dark septate fungi in seedlings of four members of the Pinaceae. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Mycorrhiza*, 18(2), 103-110. <https://doi.org/10.1007/s00572-007-0157-y>
- Wehner, J., Powell, J. R., Muller, L. A. H., Caruso, T., Veresoglou, S. D., Hempel, S., . . . van der Heijden, M. (2014). Determinants of root-associated fungal communities within Asteraceae in a semi-arid grassland. *Journal of Ecology*, 102(2), 425-436. <https://doi.org/10.1111/1365-2745.12197>
- White, T. J., Bruns, T., Lee, S., & Taylor, J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetic. In A. Press (Ed.), *PCR protocols* (pp. 315). San Diego: Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-372180-8.50042-1>
- Zhang, T., Jia, R.-L., & Yu, L.-Y. (2016). Diversity and distribution of soil fungal communities associated with biological soil crusts in the southeastern Tengger Desert (China) as revealed by 454 pyrosequencing. *Fungal Ecology*, 23, 156-163. <https://doi.org/10.1016/j.funeco.2016.08.004>