

## **INFORMATION TO USERS**

**This manuscript has been reproduced from the microfilm master. UMI films the text directly from the original or copy submitted. Thus, some thesis and dissertation copies are in typewriter face, while others may be from any type of computer printer.**

**The quality of this reproduction is dependent upon the quality of the copy submitted. Broken or indistinct print, colored or poor quality illustrations and photographs, print bleedthrough, substandard margins, and improper alignment can adversely affect reproduction.**

**In the unlikely event that the author did not send UMI a complete manuscript and there are missing pages, these will be noted. Also, if unauthorized copyright material had to be removed, a note will indicate the deletion.**

**Oversize materials (e.g., maps, drawings, charts) are reproduced by sectioning the original, beginning at the upper left-hand corner and continuing from left to right in equal sections with small overlaps.**

**Photographs included in the original manuscript have been reproduced xerographically in this copy. Higher quality 6" x 9" black and white photographic prints are available for any photographs or illustrations appearing in this copy for an additional charge. Contact UMI directly to order.**

**Bell & Howell Information and Learning  
300 North Zeeb Road, Ann Arbor, MI 48106-1346 USA  
800-521-0600**

**UMI<sup>®</sup>**





**Université d'Ottawa • University of Ottawa**



**EFFET DE LA MYCORHIZATION SUR DES SYSTÈMES  
ENZYMATIQUES DE DÉFENSE  
CHEZ LE MAÏS (*Zea mays* L.)**

© Catherine Verreault

**Thèse soumise à  
l'École des études supérieures et de la recherche  
Université d'Ottawa  
en vue de l'obtention de la maîtrise ès sciences**

**L'Institut de biologie d'Ottawa-Carleton**



National Library  
of Canada

Acquisitions and  
Bibliographic Services

395 Wellington Street  
Ottawa ON K1A 0N4  
Canada

Bibliothèque nationale  
du Canada

Acquisitions et  
services bibliographiques

395, rue Wellington  
Ottawa ON K1A 0N4  
Canada

*Your file Votre référence*

*Our file Notre référence*

The author has granted a non-exclusive licence allowing the National Library of Canada to reproduce, loan, distribute or sell copies of this thesis in microform, paper or electronic formats.

The author retains ownership of the copyright in this thesis. Neither the thesis nor substantial extracts from it may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

L'auteur a accordé une licence non exclusive permettant à la Bibliothèque nationale du Canada de reproduire, prêter, distribuer ou vendre des copies de cette thèse sous la forme de microfiche/film, de reproduction sur papier ou sur format électronique.

L'auteur conserve la propriété du droit d'auteur qui protège cette thèse. Ni la thèse ni des extraits substantiels de celle-ci ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.

0-612-46618-3

Canada

***Il en pousse davantage dans votre jardin  
que ce que vous y avez semé.***

**Auteur inconnu**

## RÉSUMÉ

Des études ont montré que la mycorhization peut induire la synthèse de composés phénoliques associés à la protection des plantes vis-à-vis de stress environnementaux. Cette protection serait bénéfique à la plante hôte, surtout lors des premières étapes de la colonisation mycorhizienne. Il est postulé que la symbiose mycorhizienne induit des changements dans la synthèse des phénols, en particulier aux premiers stades de croissance du maïs. Le métabolisme des phénols est étudié via l'analyse de la phénylalanine ammonia-lyase (PAL) et de la peroxydase ainsi que par la détermination de composés phénoliques via des techniques de spectrophotométrie et de CLHP. Les plants ont été cultivés en serre selon une distribution aléatoire. Deux cultivars de maïs, Pioneer 3737 et Pride K127, ont été colonisés ou non avec *Glomus intraradices* Schenck et Smith (Premier Tech). Les plants ont été récoltés de la deuxième à la dixième semaine de croissance. La colonisation racinaire est d'environ 20 % chez les deux cultivars. La mycorhization tend à accroître l'activité de la PAL à la cinquième semaine de croissance. L'activité de la peroxydase est significativement plus élevée chez les plants mycorhizés pour toutes les semaines évaluées. Pour ce qui est de la concentration en protéines et en phénols solubles, les cultivars répondent différemment à la mycorhization à certaines semaines. La présence du champignon endomycorhizien n'influence pas la concentration en acides hydroxamiques chez Pioneer 3737. L'absence de différence significative entre les plants mycorhizés et les plants témoins peut être attribuée à la faible colonisation du maïs. La présence du champignon mycorhizien tend à induire une réaction enzymatique de défense aux premiers stades de colonisation et de croissance, chez le maïs.



## ABSTRACT

Many studies have shown that mycorrhizal symbiosis can induce synthesis of phenolic compounds associated with plant protection against environmental stress factors. This protection could be beneficial for the plant, especially at early stages of mycorrhizal colonization. Therefore, it is hypothesized that mycorrhizal symbiosis induces changes in phenolic synthesis in the early stages of corn growth. Phenolic synthesis was studied by analyzing the activity of phenylalanine ammonia-lyase and peroxidase and determining the concentration of phenolic compounds by spectrophotometry and HPLC. Two corn cultivars, Pioneer 3737 and Pride K127, were grown in the greenhouse, colonized or not with *Glomus intraradices* Schenck and Smith (Premier Tech). Plants were harvested from the second to the tenth week of growth. Mycorrhizal colonization was around 20 % for both maize cultivars. Mycorrhizae tend to enhance PAL activity in corn roots at the fifth week. Peroxidase activity was significantly higher in mycorrhizal plants for all weeks studied. The concentrations of proteins and soluble phenolics were influenced by cultivars and mycorrhizae at certain weeks. Hydroxamic acid concentration was not different in mycorrhizal and non-mycorrhizal corn roots of Pioneer 3737. The low root colonization might have influenced the lack of differences between mycorrhizal and control plants. Mycorrhizal symbiosis seemed to induce an enzymatic defense response in maize at early stages of growth and colonization.

## **REMERCIEMENTS**

Je remercie ma superviseure, Dre Christiane Charest, de m'avoir donné la possibilité de faire ce projet de maîtrise ainsi que pour sa disponibilité et son appui. Je remercie aussi les membres de mon comité d'encadrement, Dr J.T. Arnason de l'Université d'Ottawa et Dr M. L. Smith de l'Université Carleton.

Merci à Dr J.T. Arnason et aux gens de son laboratoire pour leur aide lors de l'extraction et de l'analyse des acides hydroxamiques. Merci spécialement à Alain Boucher pour son aide précieuse lors de ce projet. Merci à Dr L. Reid et Dr S. Nelson, Agriculture et agro-alimentaire Canada, qui m'ont fourni les semences des cultivars de maïs et m'ont donné la possibilité d'utiliser les serres pour mon expérience préliminaire. Et merci à Premier Tech, Rivière du Loup, qui m'a fourni les champignons mycorhiziens.

Plusieurs gens méritent d'être remerciés pour leur aide lors de mes nombreuses récoltes de maïs: Alain Boucher, Caroline Boudreault, Annie-Chantal Guibord, Janick Lalonde, Catherine Podezsfinski, Kizhaeral Subramanian et Alicja Zmudzinska.

Finalement, un gros merci à mes parents pour leurs encouragements ainsi qu'à ma soeur Jacinthe, sans oublier Gabriel sur qui je peux toujours compter et qui donne sans compter.

## **TABLE DES MATIÈRES**

	<b>Page</b>
RÉSUMÉ	I
ABSTRACT	II
REMERCIEMENTS	III
Liste des tableaux	VII
Liste des figures	IX
Liste des abréviations	XII
<b>1. INTRODUCTION</b>	
1.1 La symbiose mycorhizienne	1
1.2 Systèmes de défense	4
1.2.1 Les systèmes enzymatiques de défense chez les plantes	6
1.2.2 Composés phénoliques	8
1.3 Le maïs	11
1.4 Hypothèse	12
1.5 Objectif général	13
1.6 Objectifs spécifiques	13
1.7 Originalité	14
<b>2. MATÉRIEL ET MÉTHODES</b>	
2.1 Expérience préliminaire en serre à AAC	15
2.2 Première expérience en serre à l'Université d'Ottawa	16
2.3 Deuxième expérience en serre à l'Université d'Ottawa	18
2.4 Détermination de la colonisation mycorhizienne	18
2.5 Mesure des paramètres de croissance	19
2.6 Méthode de détermination de l'activité de la PAL	20

	<b>Page</b>
2.7 Détermination de la concentration en protéines	21
2.8 Détermination de la concentration des phénols solubles	22
2.9 Détermination de l'activité de la peroxydase	22
2.10 Extraction des acides hydroxamiques	23
2.11 Analyses statistiques	25
<b>3. RÉSULTATS</b>	
3.1 Colonisation mycorhizienne	26
3.2 Paramètres de croissance	28
3.3 Concentration en protéines	43
3.4 Activité de la PAL	50
3.5 Activité de la peroxydase	55
3.6 Phénols solubles	60
3.7 Acides hydroxamiques	67
<b>4. DISCUSSION</b>	
4.1 Colonisation mycorhizienne	72
4.2 Paramètres de croissance	73
4.3 Concentration en protéines	75
4.4 Activité de la PAL	76
4.5 Activité de la peroxydase	78
4.6 Phénols solubles	80
4.7 Acides hydroxamiques	81
4.8 Conclusion	82
<b>5. RÉFÉRENCES</b>	84
<b>6. ANNEXES</b>	
Annexe A: Solution d'Hoagland	97

	<b>Page</b>
<b>Annexe B: Courbes étalons pour la détermination des protéines et des phénols solubles</b>	<b>99</b>
<b>Annexe C: Spectre d'absorbance du DIMBOA et du MBOA à 264 nm en fonction du temps de rétention des deux composés</b>	<b>102</b>
<b>Annexe D: Tableaux des tests t de Student et Tukey-Kramer suite aux ANOVA</b>	<b>104</b>

## **LISTE DES TABLEAUX**

	<b>Page</b>
Tableau 1 Colonisation mycorhizienne (en pourcentage) des deux cultivars de maïs, obtenue lors d'une étude préliminaire et des deux expériences en serre.	27
Tableau 2 Analyse de variance à trois facteurs pour la biomasse des tiges et des racines ainsi que la biomasse totale des plants de la première expérience.	31
Tableau 3 Analyse de variance à deux facteurs pour la biomasse des tiges et des racines ainsi que la biomasse totale des plants de la deuxième expérience.	35
Tableau 4 Analyse de variance à trois facteurs pour la hauteur des plants de la première expérience.	39
Tableau 5 Analyse de variance à deux facteurs pour la hauteur des plants de la deuxième expérience.	41
Tableau 6 Analyse de variance à trois facteurs pour la concentration en protéines des feuilles et des racines des plants de la première expérience.	44
Tableau 7 Analyse de variance à deux facteurs pour la concentration en protéines des feuilles et des racines des plants de la deuxième expérience.	47
Tableau 8 Analyse de variance à trois facteurs pour l'activité de la PAL des racines des plants de la première expérience.	51
Tableau 9 Analyse de variance à deux facteurs pour l'activité de la PAL des racines des plants de la deuxième expérience.	53
Tableau 10 Analyse de variance à trois facteurs pour l'activité de la peroxydase des racines des plants de la première expérience.	56

- Tableau 11** Analyse de variance à deux facteurs pour l'activité de la 58  
peroxydase des racines des plants de la deuxième  
expérience.
- Tableau 12** Analyse de variance à trois facteurs pour la concentration en 61  
phénols solubles des feuilles des plants de la première  
expérience.
- Tableau 13** Analyse de variance à deux facteurs pour la concentration en 63  
phénols solubles des racines des plants de la quatrième  
semaine de la première expérience.
- Tableau 14** Analyse de variance à deux facteurs pour la concentration en 65  
phénols solubles des feuilles des plants de la deuxième  
expérience.
- Tableau 15** Analyse de variance à deux facteurs pour les concentrations 68  
de DIMBOA et de MBOA des racines des plants de la  
deuxième expérience.

## **LISTE DES FIGURES**

	<b>Page</b>
Figure 1.1 Les différents types de symbioses mycorhiziennes et leurs structures caractéristiques.	2
Figure 1.2 Structure moléculaire du DIMBOA et du MBOA.	10
Figure 3.1 Biomasse des parties aériennes des plants mycorhizés et des témoins des deux cultivars pour la première expérience.	32
Figure 3.2 Biomasse des racines des plants mycorhizés et des témoins des deux cultivars de la première expérience.	33
Figure 3.3 Biomasse totale des plants mycorhizés et des témoins des deux cultivars pour la première expérience.	34
Figure 3.4 Biomasse des parties aériennes des plants mycorhizés et des témoins de la deuxième expérience.	36
Figure 3.5 Biomasse racinaire des plants mycorhizés et des témoins de la deuxième expérience.	37
Figure 3.6 Biomasse totale des plants mycorhizés et des témoins de la deuxième expérience.	38



Figure 3.7	<b>Hauteur des plants mycorhizés et des témoins des deux cultivars de la première expérience.</b>	<b>40</b>
Figure 3.8	<b>Hauteur des plants mycorhizés et des témoins de la deuxième expérience.</b>	<b>42</b>
Figure 3.9	<b>Concentration en protéines des feuilles des plants mycorhizés et des témoins des deux cultivars pour la première expérience.</b>	<b>45</b>
Figure 3.10	<b>Concentration en protéines des racines des plants mycorhizés et des témoins des deux cultivars pour la première expérience.</b>	<b>46</b>
Figure 3.11	<b>Concentration en protéines des feuilles des plants mycorhizés et des témoins pour la deuxième expérience.</b>	<b>48</b>
Figure 3.12	<b>Concentration en protéines des racines des plants mycorhizés et des témoins pour la deuxième expérience.</b>	<b>49</b>
Figure 3.13	<b>Activité de la PAL des racines des plants mycorhizés et des témoins des deux cultivars pour la première expérience.</b>	<b>52</b>
Figure 3.14	<b>Activité de la PAL des racines des plants mycorhizés et des témoins pour la deuxième expérience.</b>	<b>54</b>

<b>Figure 3.15</b>	<b>Activité de la peroxydase des racines des plants mycorhizés et des témoins des deux cultivars pour la première expérience.</b>	<b>57</b>
<b>Figure 3.16</b>	<b>Activité de la peroxydase des racines des plants mycorhizés et des témoins de la deuxième expérience.</b>	<b>59</b>
<b>Figure 3.17</b>	<b>Concentration en phénols solubles des feuilles des plants mycorhizés et des témoins des deux cultivars pour la première expérience.</b>	<b>62</b>
<b>Figure 3.18</b>	<b>Concentration en phénols solubles des racines des plants mycorhizés et des témoins des deux cultivars pour la quatrième semaine de la première expérience.</b>	<b>64</b>
<b>Figure 3.19</b>	<b>Concentration en phénols solubles des feuilles des plants mycorhizés et des témoins de la deuxième expérience.</b>	<b>66</b>
<b>Figure 3.20</b>	<b>Concentration en DIMBOA des racines des plants mycorhizés et des témoins de la deuxième expérience.</b>	<b>69</b>
<b>Figure 3.21</b>	<b>Concentration en MBOA des racines des plants mycorhizés et des témoins de la deuxième expérience.</b>	<b>70</b>
<b>Figure 3.22</b>	<b>Concentration en DIMBOA et MBOA des racines des plants mycorhizés et des témoins de la deuxième expérience.</b>	<b>71</b>

## **LISTE DES ABRÉVIATIONS**

<b>AAC</b>	<b>Agriculture et agro-alimentaire Canada, Ottawa</b>
<b>ANOVA</b>	<b>analyse de variance</b>
<b>°C</b>	<b>degré Celcius</b>
<b>CLHP</b>	<b>chromatographie liquide à haute performance</b>
<b>cm</b>	<b>centimètre</b>
<b>DIMBOA</b>	<b>2,4-dihydroxy-7-methoxy-1,4-benzoxazin</b>
<b>DTT</b>	<b>DL-dithiothreitol</b>
<b>g</b>	<b>gramme</b>
<b>kg</b>	<b>kilogramme</b>
<b>MVA</b>	<b>mycorhizes à vésicules et arbuscules</b>
<b>MBOA</b>	<b>6-methoxybenzoxazolinone</b>
<b>mg</b>	<b>milligramme</b>
<b>min</b>	<b>minute</b>
<b>ml</b>	<b>millilitre</b>
<b>µl</b>	<b>microlitre</b>
<b>NADH</b>	<b>nicotinamide adénine dinucléotide (forme réduite)</b>
<b>nm</b>	<b>nanomètre</b>
<b>PAL</b>	<b>phénylalanine ammonia-lyase</b>
<b>PIO</b>	<b>le cultivar de maïs Pioneer 3737</b>
<b>PRI</b>	<b>le cultivar de maïs Pride K127</b>
<b>PVLG</b>	<b>polyvinyl-alcohol-lactic acid-glycerol</b>
<b>PVP</b>	<b>polyvinyl-pyrrolidone</b>
<b>sec</b>	<b>seconde</b>

## **INTRODUCTION**

Depuis longtemps, les plantes sont cultivées à grande échelle, afin de satisfaire les besoins en alimentation sans cesse croissants de la population mondiale. D'énormes quantités d'argent et de temps ont été vouées à l'augmentation du rendement des cultures, que ce soit en améliorant les méthodes de culture, la génétique des plantes, ou en augmentant l'utilisation de pesticides et de fertilisants chimiques. Le virage "vert" nous a amenés à nous tourner vers des moyens plus "écologiques" en vue d'une production optimale; la symbiose mycorhizienne s'avère un moyen tout indiqué pour parvenir à cette fin.

### **1.1 La symbiose mycorhizienne**

Il existe plusieurs types d'associations mycorhiziennes (Harley 1994). Les mycorhizes à vésicules et arbuscules s'associent aux Bryophytes, Ptéridophytes et Angiospermes; les ectomycorhizes forment des symbioses avec les Gymnospermes et les Angiospermes, et les ectendomycorhizes. Les mycorhizes arbutoïdes et les éricoïdes s'associent aux Éricacées, les monotropoïdes aux Monotropacées et même les Orchidacées possèdent leur propre type de mycorhize (Figure 1.1). Mon étude porte sur les endomycorhizes à vésicules et arbuscules (MVA).

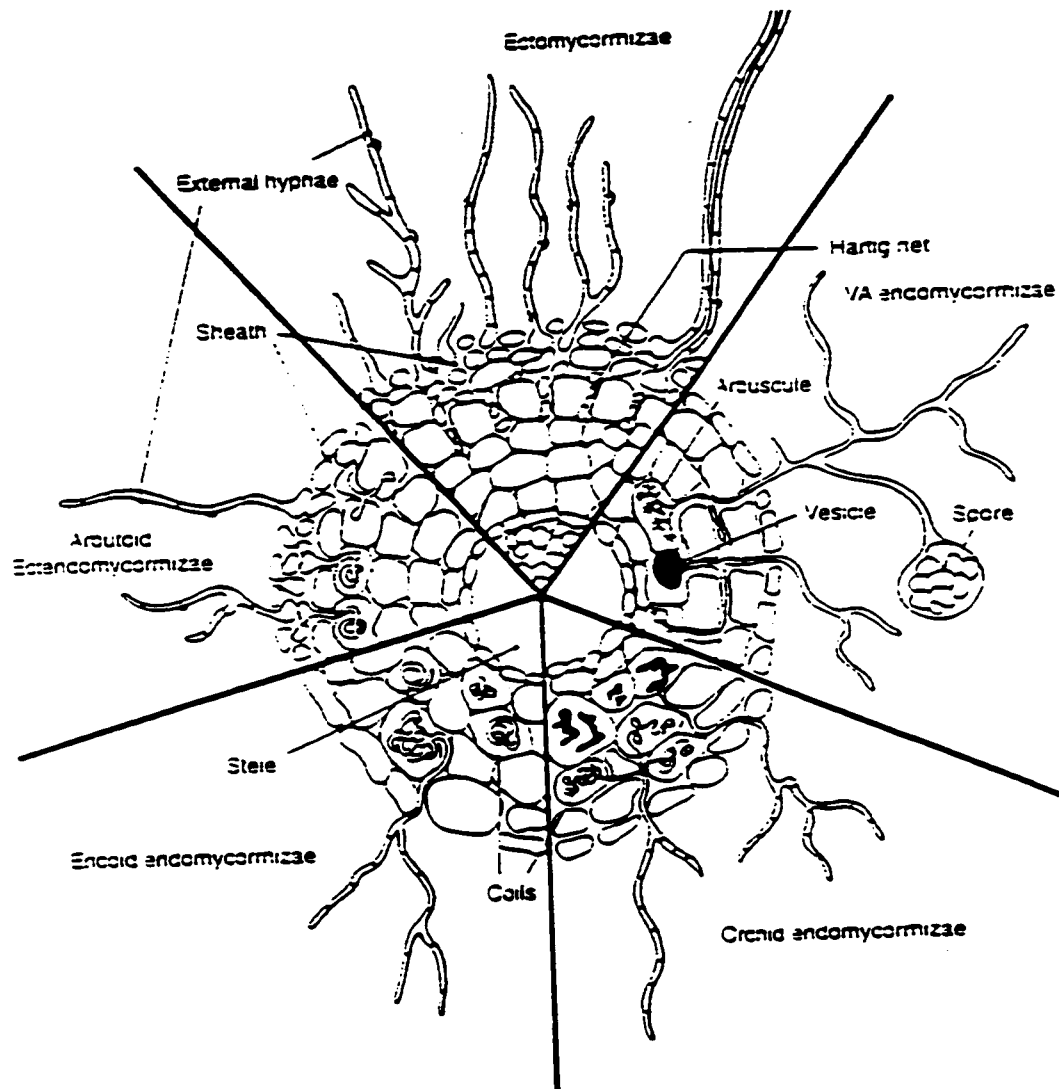


Figure 1.1 Les différents types de symbioses mycorhiziennes et leurs structures caractéristiques. Tiré de: Selosse et Le Tacon 1998, TREE 13, p.16.

Découverte par Frank en 1885, la symbiose mycorhizienne à vésicules et arbuscules existe probablement depuis 400 millions d'années (Dalpé 1995). Plus de 80% des plantes à fleurs bénéficient de cette symbiose (Smith et Gianinazzi-Pearson 1988). La présence de cette symbiose a probablement été importante lors de la colonisation du sol par les plantes (Simon et al. 1993). Les champignons endomycorhiziens font partie de la division des Zygomycètes, de l'ordre des Glomales, du sous-ordre des Glomineae (champignon à vésicules et arbuscules) et de la famille des Glomacées, où l'on retrouve deux genres: *Glomus* et *Sclerocystis*, caractérisés par une croissance apicale et des hyphes cénocytiques (Dalpé 1995).

Trois composantes importantes forment les MVA: les racines de la plante hôte, les structures fongiques présentes à l'intérieur des cellules racinaires et le mycélium extraradical dans le sol. Les MVA sont caractérisées (Figure 1.1), comme leur nom le suggère, par des structures particulières: les vésicules présentes dans ou entre les cellules corticales et les arbuscules présents à l'intérieur des cellules corticales (Smith et Read 1997). Environ 80% des champignons endomycorhiziens forment des vésicules et des arbuscules, le genre *Glomus* en fait partie. Chaque structure du champignon a une fonction particulière. Les hyphes sont de longs filaments de mycélium qui répondent à la présence des racines en croissant vers elles. Elles pénètrent les racines de la plante hôte jusqu'au cortex. Les arbuscules ressemblent à des arbres miniatures. Ces hyphes minuscules ramifiés constituent le lieu d'échange symbiotique avec la plante hôte. Les vésicules sont des renflements d'hyphes. Elles ont une paroi cellulaire très épaisse et accumulent les lipides. Elles ont la fonction de spores chez certaines espèces (Brundrett et al. 1996).

Ce n'est qu'au début des années 1970 (Smith et Gianinazzi-Pearson 1988) que l'on s'est vraiment intéressé aux recherches concernant les effets de cette symbiose sur la physiologie des plantes hôtes. Il est maintenant reconnu que la mycorhization contribue, entre autres, à l'amélioration de la croissance des plantes, en raison d'un échange de nutriments entre les deux symbiotes. Le champignon endomycorhizien bénéficie des sucres produits par la plante et lui, en retour, accroît l'assimilation du phosphore et autres minéraux chez la plante hôte. Des études ont montré que la résistance de certaines espèces végétales à des facteurs de stress tels que la sécheresse (Subramanian et Charest 1995, 1997, 1998; Subramanian et al. 1995, 1997), le froid (Charest et al. 1993) et les organismes pathogènes (Benhamou et al. 1994; St-Arnaud et al. 1994) est accrue par cette symbiose. Le potentiel de cette association ne sera pleinement exploité que lorsque plusieurs autres aspects seront approfondis.

## 1.2 Systèmes de défense

Des études ont montré que, bien qu'étant une interaction bénéfique, la mycorhization peut induire la synthèse de composés phénoliques (Spanu et Bonfante-Fasolo 1988; Maier et al. 1995; Nagahashi et al. 1996; Peipp et al. 1997), généralement associés à la défense des plantes (Gianinazzi-Pearson et al. 1996). Cette réaction de défense (ou pseudo-défense), qui serait surtout présente lors des premières étapes de la colonisation de la plante hôte (Volpin et al. 1994), s'avérerait bénéfique en ce qui a trait à la protection de la plante contre d'autres micro-organismes pathogènes ou, du moins, non bénéfiques. Du point de vue

appliqué, la mycorhization pourrait réduire l'ajout des intrants de pesticides nécessaires aux cultures.

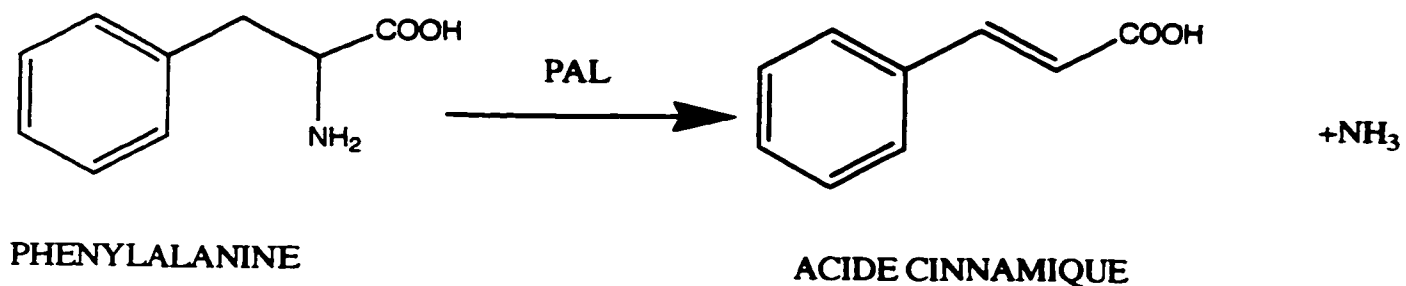
Selon Giovannetti et al. (1994), la colonisation mycorhizienne serait initialement perçue par la plante comme un stress ou une attaque, lors de l'implantation même de la colonisation par le champignon endomycorhizien, d'où la synthèse de composés secondaires au tout début de la colonisation. La synthèse et l'activité de plusieurs enzymes du métabolisme des phénylpropanoïdes comme la phénylalanine ammonia-lyase, la chalcone synthase et la chalcone isomérase, serait augmentée chez les plants mycorhizés, produisant ainsi plus de flavonoïdes et d'isoflavonoïdes (Gianinazzi-Pearson et al. 1996). Ces flavonoïdes et isoflavonoïdes pourraient stimuler la croissance des hyphes ainsi que la colonisation des racines par les MVA (Siqueira et al. 1991, Phillips et Tsai 1992). Par la suite, la plante "reconnaîtrait" le champignon non comme un organisme pathogène mais bien comme un symbiote. La symbiose pourrait donc s'établir et se développer éventuellement.

De récentes études ont montré que des changements se produisaient dans la synthèse des composés secondaires lors de la colonisation racinaire de certaines plantes telles que l'orge *Hordeum vulgare* (L.), (Peipp et al. 1997), le blé *Triticum aestivum* (L.), le seigle *Secale cereale* (L.), et l'avoine *Avena sativa* (L.) (Maier et al. 1995). L'accumulation, chez ces plantes, d'acides hydroxycinnamiques particuliers comme la blumenine, en début de colonisation mycorhizienne, révèle possiblement l'activation d'une composante du système de défense de la plante hôte en réaction à la pénétration du champignon mycorhizien (Peipp et al. 1997).



### 1.2.1 Les systèmes enzymatiques de défense chez les plantes

Les substances secondaires, tels les composés phénoliques, servent à la protection des plantes contre toute attaque ou stress biotique venant de l'extérieur, les micro-organismes pathogènes, champignons, bactéries ou nématodes. Les composés phénoliques possèdent un noyau aromatique ayant un ou plusieurs groupes hydroxyles et quelques autres substitués (Walker 1975). Ces substances proviennent du métabolisme des phénylpropanoïdes, dit cycle de l'acide shikimique. L'acide shikimique donne naissance à plusieurs substances dont les phénols dérivés des acides aminés aromatiques (Bennett et Wallsgrove 1994). La conversion de la phénylalanine en acide cinnamique est l'une des plus importantes réactions de la formation de ces dérivés. La phénylalanine ammonia-lyase (PAL, E.C. 4.3.1.5) catalyse la réaction de désamination par laquelle l'ammoniaque se sépare de la L-phénylalanine pour former l'acide *trans*-cinnamique (équation 1.1).



Cette enzyme a été découverte par Koukol et Conn (1961) et avait originalement été nommée phénylalanine désaminase. L'étude de la PAL est

intéressante puisque son activité enzymatique varie de façon significative sur une très courte période, en réponse à plusieurs stimuli (Camm et Towers 1973). Cette enzyme est retrouvée dans toutes les plantes vertes, les Basidiomycètes et *Streptomyces*. Son poids moléculaire est de 306 000 daltons chez le maïs (Camm et Towers 1973). Il existe une autre forme à cette enzyme, la tyrosine ammonia-lyase (TAL) (Havir et al. 1971) qui utilise la L-tyrosine au lieu de la L-phénylalanine comme substrat et la transforme en *trans*-p-coumarate (Hanson et Havir 1981). Suite à sa formation à l'aide de la PAL, l'acide cinnamique se convertit pour former les flavonoïdes, les anthocyanines, les coumarines, les phytoalexines, l'acide salicylique et les précurseurs de la lignine. Ces derniers forment des radicaux libres qui ont des effets toxiques directs sur les "attaquants" de la plante (Bennett et Wallsgrove 1994).

La peroxydase (E.C. 1.11.1.7) est une enzyme clé dans la polymérisation de ces composés. Cette enzyme, qui contient du fer, se présente sous différentes formes isoenzymatiques dont quelques-unes sont dans les parois cellulaires. Ces isozymes forment d'abord du peroxyde à partir du NADH et de l'oxygène, puis enlèvent un atome d'hydrogène à chacun des deux alcools aromatiques. Ces deux atomes d'hydrogène sont ensuite combinés avec le peroxyde et deux molécules d'eau sont formées comme sous-produits. Les alcools aromatiques ont été convertis en radicaux libres et plusieurs déplacements d'électrons permettent la migration de l'électron libre à d'autres endroits sur la molécule. La combinaison spontanée des radicaux libres formant ainsi des liens entre les alcools donne naissance à la lignine qui a donc une structure variable (Salisbury et Ross 1992). La peroxydase est localisée dans le cytoplasme et dans les parois cellulaires des végétaux. Elle protège les tissus végétaux infectés par des micro-organismes pathogènes, principalement de deux différentes façons. Elle peut

promouvoir l'oxydation des composés phénoliques en produits toxiques pour l'agent infectieux ou elle peut augmenter le processus de lignification des parois cellulaires, les rendant ainsi impropres à la dégradation ou la pénétration par l'agent pathogène (Birecka et al. 1975). La peroxydase peut aussi utiliser l'acide férulique comme substrat pour sa réaction (MacIsaac 1997).

### **1.2.2 Composés phénoliques**

Chez certaines plantes, la voie des polyacétates intervient pour former un second noyau benzénique à des composés possédant déjà un noyau aromatique provenant de la voie des shikimates. Les représentants les plus importants de cette catégorie sont les flavonoïdes (Guignard 1996). Ceux-ci sont des substances généralement colorées protégeant les plantes terrestres des radiations ultraviolettes. Plusieurs de ces composés sont présents chez le maïs, dont le pelargonidin-3-glucoside, le cyanidin-3-glucoside, le leucopelargonidin et le leucocyanidin (Collins 1986). Les flavonoïdes se subdivisent en plusieurs groupes dont les flavonols qui sont incolores et inhibent le transport orienté de l'auxine (Guignard 1996). Le kaempferol et la quercétine en sont deux exemples chez le maïs (Collins 1986). Chez certaines plantes, des isoflavones jouent le rôle de phytoalexines, protégeant ainsi la plante d'attaques extérieures.

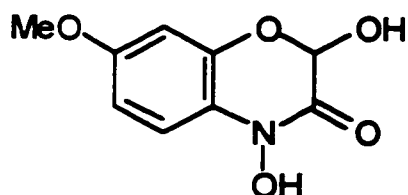
Les acides phénoliques possèdent un phénol monocyclique et un groupement d'acide carboxylique. Cette classe de composés phénoliques est dérivée du métabolisme de la phénylalanine. L'acide férulique ainsi que l'acide p-coumarique en sont les représentants les plus communs chez le maïs (Bergvinson 1993). On retrouve les acides phénoliques sous deux formes, soit

solubles ou attachés à la paroi cellulaire. Les acides phénoliques libres sont beaucoup moins fréquents que ceux conjugués aux polysaccharides par une liaison ester. Les formes solubles des acides férulique et p-coumarique sont plus souvent retrouvés sous forme conjuguée aux sucres simples (Harborne 1980). Les acides phénoliques présents dans la paroi cellulaire des Poacées sont principalement les mêmes que ceux qui sont solubles, soient l'acide férulique et l'acide p-coumarique. Ces derniers sont liés aux hémicelluloses arabinoxylan de la paroi cellulaire par des liaisons ester (Bergvinson 1993) pour former le feruloylarabinoxylan (FAX). Des peroxydases extracellulaires entraînent la dimerisation de ce composé, produisant ainsi l'acide dehydrodiférulique qui forme des ponts entre les molécules d'arabinoxylan. Ce phénomène qui endurecit la paroi cellulaire est associé à la résistance aux insectes et champignons pathogènes (Bergvinson 1993).

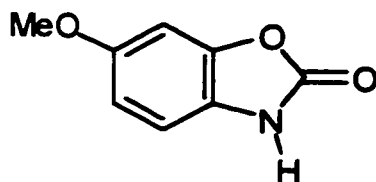
Des extraits de certaines plantes de la famille des Poacées, comme le blé, le maïs et le seigle, contiennent des acides hydroxamiques cycliques qui jouent un rôle dans la résistance de ces céréales vis-à-vis des insectes, des champignons et des bactéries (Niemeyer et al. 1982). Contrairement à la majorité des composés secondaires qui sont formés via le cycle de l'acide shikimique, les benzoxazinones partagent une grande partie de leur biosynthèse avec le tryptophane. Les acides quinique et anthranilique, précurseurs du shikimate, sont incorporés au noyau aromatique des benzoxazinones (Niemeyer 1988). Les acides hydroxamiques sont typiquement formés par la réaction d'un groupe acyle activé et d'une hydroxylamine, selon l'équation suivante (Munson 1982):



Les 1,4-benzoxazin-3-ones naturellement présents chez le maïs sont le HMBOA, le DIMBOA, le HM<sub>2</sub>BOA et le DIM<sub>2</sub>BOA. Plusieurs de ces acides hydroxamiques sont présents chez le maïs, et leurs concentrations sont les plus élevées dans ses racines. Ces concentrations varient selon les différentes variétés ainsi qu'en fonction de l'âge du maïs. Il serait donc intéressant de vérifier la présence de ces composés chez les plants de maïs en symbiose mycorhizienne, d'autant plus que Piepp et al. (1997) ont trouvé que les plants d'orge (*Hordeum vulgare*) mycorhizés avaient une plus forte concentration de certains acides hydroxycinnamiques que les plants non mycorhizés.



DIMBOA



MBOA

Figure 1.2 Structure moléculaire du DIMBOA et du MBOA.

Ces substances sont conservées dans les vacuoles des cellules du parenchyme sous forme de glycoside. Suite aux dommages faits aux cellules par des organismes pathogènes, ce sucre est libéré par un  $\beta$ -glucosidase. Les hydroxamates libres sont instables en solution aqueuse. Le taux de réaction dépend du pH et le produit principal est un benzoxazolinone. La décomposition des acides hydroxamiques en benzoxazolinones libère de l'acide formique. Différentes recherches ont démontré que le 2,4-dihydroxy-7-methoxy-(2H)-1,4-benzoxazin-3(4H)-one (DIMBOA), un acide hydroxamique important présent chez le maïs, et un produit de dégradation du DIMBOA, le 6-methoxybenzoxazolinone (MBOA), ont des effets nocifs sur les insectes, les champignons et les bactéries (Xie et al. 1991).

### 1.3 Le maïs

Le maïs (*Zea mays* L.) est une monocotylédone de la famille des Poaceae et considéré seulement comme une espèce cultivée. Son ancêtre sauvage est aussi son plus proche parent, le teosinte, *Zea mexicana* (Schrad) Kuntze (Galinat 1992 et Francis 1990). C'est une plante monoïque dont l'inflorescence femelle termine la tige et l'inflorescence mâle forme des épis à l'aisselle des feuilles supérieures (Bockholt 1979). Cette grande plante annuelle a une tige forte et érigée, un système racinaire fibreux comprenant des racines aériennes servant à son support et de longues feuilles alternes. Le maïs a une saison de croissance allant d'environ 70 jours au Canada à une saison presque continue sous les climats tropicaux (Colombie). Sa croissance exige des conditions d'humidité constante, des températures de 20°C à 47°C le jour (en fonction des cultivars), et ne descendant pas plus bas que 14°C la nuit (Flocker et Kofranek 1981).

Le maïs croît d'une façon optimale sur des sols bien drainés, comme les loams fertiles, mais s'il est fertilisé, il s'adapte à une grande variété de sols. De plus, la production de 2500 kg de maïs grain sur un hectare de terre enlève à celle-ci: 70 à 80 kg d'azote, 25 à 30 kg d'acide phosphorique ( $P_2O_5$ ), 32 à 36 kg de potasse ( $K_2O$ ) et une petite quantité de micro-nutriments (Flocker et Kofranek 1981). Alors, pour maintenir le niveau initial de fertilité du sol, il faut ajouter encore plus que ces quantités de nutriments en engrais, bien souvent, chimiques. La symbiose mycorhizienne offre une possibilité de réduction de ces engrais chimiques par l'amélioration de la croissance des plantes. Elle offre aussi la possibilité de réduire la quantité de pesticides appliquée aux cultures, par une protection accrue contre les pathogènes (Benhamou et al. 1994; St-Arnaud et al. 1994).

Le maïs a été choisi comme sujet d'étude car c'est une plante de grande importance économique qui montre une dépendance mycorhizienne relativement élevée (Plenchette et al. 1983).

#### 1.4 Hypothèse

La symbiose mycorhizienne induit des changements dans la synthèse ou le métabolisme de composés secondaires (phénoliques), plus particulièrement aux premiers stades de croissance et/ou de colonisation, chez le maïs.

## **1.5 Objectif général**

L'objectif de cette recherche est d'étudier le métabolisme des phénols (1) en analysant l'activité de la phénylalanine ammonia-lyase (PAL), enzyme clé dans la voie de synthèse des phénols (Dixon et Paiva, 1995), (2) en mesurant aussi l'activité de la peroxydase et, (3) en identifiant la présence de composés phénoliques découlant de ce métabolisme. Ces études ont été réalisées afin d'établir s'il y a synthèse ou non de ces métabolites secondaires chez le maïs en symbiose mycorhizienne.

## **1.6 Objectifs spécifiques**

Les objectifs spécifiques de cette étude sont de:

- Mettre au point une méthode expérimentale afin de quantifier l'activité enzymatique de la PAL (E.C. 4.3.1.5) à différents temps (semaines) de la croissance du maïs, afin de déterminer s'il y a une hausse de l'activité de la PAL chez les plants mycorhizés par comparaison aux témoins non mycorhizés.
- Quantifier l'activité enzymatique de la peroxydase (E.C. 1.11.1.7) à différents temps (semaines) de la croissance du maïs, afin de déterminer s'il y a une hausse de l'activité de la peroxydase chez les plants mycorhizés par comparaison aux témoins non mycorhizés.
- Déterminer la quantité de phénols solubles présents dans la tige et les racines de la plante à différents stades de croissance du maïs.



- Déterminer la présence de deux acides hydroxamiques, le DIMBOA et le MBOA, à différents temps de la croissance du maïs en symbiose mycorhizienne.
- Évaluer l'impact de la mycorhization sur des paramètres physiologiques (biomasse, hauteur) et des paramètres biochimiques (protéines).

### 1.7 Originalité

La quantification de l'activité enzymatique de la PAL et de la peroxydase à différents temps de la croissance des plants de maïs en symbiose mycorhizienne est un nouvel aspect de la recherche sur les mécanismes de défense chez les plant mycorhizés. En effet, l'activité de ces enzymes lors de la croissance de plants mycorhizés a été mesurée chez certaines espèces comme *Allium porrum*, *Ginkgo biloba* (Spanu et Bonfante-Fasolo 1988, Codignola et al. 1989), *Medicago sativa* (Volpin et al. 1994) et *Phaseolus vulgaris* (Blee et Anderson 1996, Mohr et al. 1998). Cependant, les conclusions de ces études varient selon les plantes et certaines ont quantifié l'activité enzymatique qu'à un seul moment de la croissance de la plante.

## **MATÉRIEL ET MÉTHODES**

### **2.1 Expérience préliminaire en serre à Agriculture et agro-alimentaire Canada**

Une expérience préliminaire a été effectuée dans les serres d'Agriculture et agro-alimentaire Canada, Ottawa (AAC). Deux cultivars de maïs fournis par Dr L. Reid, AAC, ont été utilisés. Le choix de ces deux cultivars était basé sur leur niveau différent de mycorhization à partir de résultats d'une étude au champ (S. Nelson, comm. pers.). Le cultivar Pioneer 3737 (PIO) avait un plus faible pourcentage de mycorhization, 14%, que Pride K127 (PRI), 53%. Pour débarrasser les graines du fongicide dont elles sont enrobées, elles ont été rincées à l'eau distillée pendant 12 heures avant de les planter. Comme design expérimental, les plants ont été disposés selon une distribution aléatoire tout en évitant la contamination entre les plants mycorhizés et non mycorhizés. Six graines ont été semées dans chaque contenant de type "rubbermaid" de 65 litres mesurant 65 cm X 40.6 cm X 42 cm . Après la germination, des plantules ont été enlevées pour porter le nombre à trois par bac. Ces trois plants ont été récoltés à des stades de croissance différents: soit à la deuxième, la quatrième et la huitième semaine; soit à la troisième, la cinquième et la dixième semaine; ou encore à la deuxième, la troisième et la quatrième semaine, de façon à ce que les plantes les plus matures aient plus d'espace. Le nombre de semaines a été calculé à partir du jour de la plantation. Le substrat utilisé a été la vermiculite et la moitié des plants ont été mycorhizés avec *Glomus intraradices* Schenk & Smith, fourni par Premier Tech, Rivière du Loup, à raison de 250 grammes d'inoculum par contenant. L'autre moitié des plants a aussi reçu 250 grammes d'un même mélange sans inoculum.

Les plants ont été fertilisés toutes les semaines, à partir de la deuxième semaine, avec une solution d'Hoagland (Hoagland et Arnon 1950, Annexe A), à raison de 500 ml par contenant. La récolte se faisait le même jour que la fertilisation, afin que les plants qui devaient être récoltés la semaine suivante aient le temps d'assimiler les nutriments, évitant ainsi de fausser les résultats lors des analyses ultérieures. Les plants ont été irrigués à saturation trois fois par semaine. Après la récolte, les plants ont été congelés à  $-60^{\circ}\text{C}$ , lyophilisés, puis congelés à  $-20^{\circ}\text{C}$  jusqu'à leur utilisation.

Malheureusement, dès la 5<sup>e</sup> semaine, certains plants, surtout ceux du cultivar PRI, ont montré des signes anormaux: coloration rouge et blanche, plants petits mais formant plusieurs feuilles au lieu d'une flèche terminale distincte. Après avoir investigué toutes les causes possibles, la chaleur semble être la cause de ce traumatisme infligé aux plants car ceux placés près du système de climatisation ont été moins affectés que les autres. À certains jours de canicule les auvents permettant la circulation d'air n'ont pas été ouverts, ajoutant à la chaleur torride. C'est pourquoi les échantillons affectés n'ont pas été utilisés à des fins d'analyse. Je me suis par contre servi du matériel de cette expérience pour mettre au point la méthode expérimentale d'analyse de la PAL.

## **2.2 Première expérience en serre à l'Université d'Ottawa**

Afin de mieux contrôler les conditions expérimentales, j'ai fait croître une autre série de plants dans les serres de l'Université d'Ottawa. Le même inoculum et les mêmes cultivars ont été utilisés. Par contre, chaque plant du pot était récolté au même moment (pour maximiser la récolte de racines). Les pots en

plastique mesuraient 21.5 cm (hauteur) par 22 cm (diamètre). Le mélange de croissance se composait de vermiculite: terreau: sable (1v.:1v.:1v.), pour un total de 5 litres par pot. Ce mélange a été autoclavé (autoclave Amsco, modèle 2022) 45 minutes à la vapeur, à une température d'environ 125°C. Le substrat de croissance a été changé suite à des expérimentations dans les serres de l'Université d'Ottawa qui ont permis de déterminer le mélange optimal pour ces cultivars. L'inoculum a été utilisé de la même façon qu'à l'expérience précédente en employant 200 ml par pot. Les plants ont été récoltés après 2, 3, 4, 5, 6, 7 et 10 semaines de croissance. Donc, pour un total de 128 pots, 64 sont mycorhizés, 64 témoins et la moitié de chacun de ces plants proviennent du cultivar PIO et l'autre moitié de PRI.

Chaque traitement comptait 4 répétitions sauf pour celui de la deuxième semaine qui en avait huit, car les plants étant plus petits, plus de matériel s'avérait nécessaire. Les pots ont été répartis selon une distribution aléatoire, tout en gardant les pots mycorhizés séparés des pots témoins pour éviter la contamination. Chaque semaine, une rotation des pots a été faite pour s'assurer que tous les plants recevaient une quantité égale de lumière. La température moyenne de la serre était de 25°C le jour et de 20°C la nuit. La durée d'ensoleillement était de 15 heures par jour et l'intensité lumineuse variait entre 450  $\mu\text{moles}/\text{m}^2/\text{sec}$ . pour les plants directement sous la lumière et 300  $\mu\text{moles}/\text{m}^2/\text{sec}$ . pour les plant situés entre les sources lumineuses d'appoint (lampes à sodium). Les plants ont été irrigués au besoin et à saturation, environ trois fois pas semaine. Chaque semaine, les plants ont été fertilisés avec un mélange chimique 30:10:10 d'azote: acide phosphorique: potasse (Plant Products Co. Ltd., Brampton, Ontario) à raison de 0.78g/plant/semaine dilué dans 500 ml d'eau, quantité calculée selon la demande en nutriments du maïs. Le fertilisant

utilisé était intentionnellement bas en phosphore pour favoriser la mycorhization.

### **2.3 Deuxième expérience en serre à l'Université d'Ottawa**

Afin de préciser les résultats de l'expérience précédente, une autre expérience en serre a été refaite en augmentant le nombre de répétitions pour chaque traitement. Les conditions de croissance des plantes sont essentiellement les mêmes. Par contre, seulement un cultivar, Pioneer 3737 (PIO) a été utilisé, car aucune différence significative n'a été obtenue entre les deux cultivars lors des expériences précédentes. Je me suis concentrée sur trois semaines de récolte au lieu de sept: les semaines 3, 5 et 7, et le nombre de répétitions a augmenté de quatre à dix pour chaque traitement. Les procédures de récolte et de conservation étaient aussi les mêmes qu'à l'expérience précédente.

Parallèlement à cette expérience, nous avons aussi fait croître des plants pour analyser la quantité d'acides hydroxamiques, selon les mêmes conditions de croissance. Les racines de 5 répétitions ont été récoltées de la deuxième à la sixième semaine. La moitié des plants du cultivar PIO était mycorhizée, et l'autre moitié servait de témoin. Suite à la récolte, les racines ont été épongées, puis congelées à -20°C jusqu'à leur utilisation.

### **2.4 Détermination de la colonisation mycorhizienne**

Les racines utilisées ont été sélectionnées aléatoirement sur chaque plant âgé de dix semaines. La colonisation racinaire a été déterminée selon la méthode

décrite par Dalpé (1993). Après avoir lavé les racines, celles-ci ont été immergées dans une solution de KOH 2.5%, puis chauffées au micro-ondes (Kenmore, modèle 87341) pendant environ 30 secondes à puissance moyenne. Ensuite, elles ont été rincées à l'eau distillée et mises dans du HCl 1% pendant la nuit, afin de bien les acidifier pour pouvoir les teindre. Le lendemain, les racines ont été rincées puis placées dans une solution de bleu d'aniline 0.02% et chauffées au four à micro-ondes pendant 25 secondes à puissance maximale. Ensuite, la solution de teinture a été retirée et les racines placées dans une solution de glycérol dans laquelle elles peuvent être conservées jusqu'au montage.

Pour chaque répétition, soixante sections de racines, d'environ un centimètre chacune, ont été placées sur des lames à l'aide de PVLG (polyvinyl-alcohol-lactic acid-glycerol), puis observées au microscope à un grossissement de 400X, afin de déterminer la présence d'hyphes, de vésicules ou d'arbuscules. Une racine était considérée mycorhizée lorsqu'il y avait présence soit de vésicule, d'arbuscule ou d'hyphe pénétrant la racine. Le pourcentage de colonisation a été calculé par la formule suivante:

$$\frac{\text{Nombre total de racines colonisées}}{\text{Nombre total de racines observées}} \times 100 \quad (2.1)$$

## 2.5 Mesures des paramètres de croissance

Au moment de la récolte, la hauteur de chaque plant a été mesurée à l'aide d'une règle graduée en centimètres. Suite à la lyophilisation, la masse sèche des tiges et des racines a aussi été notée. La biomasse totale des plants est

la somme de la masse sèche des parties aériennes (tige et feuilles) et de celle des racines.

## **2.6 Méthode de détermination de l'activité de la phénylalanine ammonia-lyase**

Les plants de l'expérience préliminaire en serre à AAC ont servi à mettre au point une méthode pour quantifier spectrophotométriquement l'activité enzymatique de la PAL dans les racines du maïs. Plusieurs méthodes ont été consultées, donc plusieurs essais ont été faits. Ces essais ont servi à déterminer: les concentrations et les proportions des réactifs, la nature des filtres à utiliser (gel (Sephadex G-75) *vs* papier), la température et le temps d'incubation, les temps optimaux de la réaction enzymatique, le type optimal de cuvettes et les différents témoins.

La méthode de Bhattacharayya et Ward (1988) a donc été modifiée pour l'analyse de la PAL. Pour chacun des extraits, sur la glace, à l'aide d'un mortier et d'un pilon, 100 mg de racines lyophilisées ont été moulues avec 50 mg de polyvinyl-pyrrolidone (PVP), 1.5 mg de DL-dithiothreitol (DTT) ajoutés à 10 ml d'une solution de borate de sodium 0.1M, pH 8.8. Le mélange homogène a été centrifugé 30 minutes à 10320 g à 4°C. Le surnageant a été filtré à l'aide d'un papier filtre Whatman No. 1. Ensuite, à 0.5 ml d'extrait, 1 ml de borate de sodium 300µM pH 8.8 et 0.5 ml de L-phénylalanine 30µM (remplacé par la D-phénylalanine pour le témoin) ont été ajoutés. Le reste de l'extrait a été congelé pour la détermination ultérieure des protéines. Les tubes ont été incubés une heure à 40°C, non-couverts (bain: Techne Trempelette TE-8A Refrigerated Bath

RB-5). Finalement, 0.1 ml de HCl 5N a été ajouté à chacun des tubes pour stopper la réaction. L'absorbance a été lue à 290 nm (Spectrophotomètre Beckman DU 62), et le zéro fait avec une solution dont l'extrait est remplacé par le tampon. L'activité enzymatique a été calculée en faisant la différence entre les lectures d'absorbance du mélange réactif avec de la D-phénylalanine et celui contenant de la L-phénylalanine.

## **2.7 Détermination de la concentration en protéines**

La quantité de protéines a été déterminée selon la méthode de Bradford (1976). La quantité de protéines dans les racines de maïs a été déterminée directement à l'aide des extraits congelés suite à l'extraction pour l'évaluation de la PAL. Ces extraits ont été décongelés, puis filtrés avec un filtre Whatman No. 1. La concentration en protéines des feuilles a été déterminée systématiquement par la méthode de Bradford (1976). Cette méthode consiste à ajouter à 0.1 ml d'extrait à 5 ml de réactif BioRad dilués. Après avoir laissé cette solution pendant 10 minutes à la température de la pièce (20-25°C), l'absorbance à 595 nm a été notée (spectrophotomètre Pharmacia Biotech Novaspec II). L'absorbance a été convertie en concentration de protéines (mg) par gramme de matière sèche à partir de la courbe étalon basée sur des concentrations connues de sérum d'albumine bovine (BSA). La courbe étalon utilisée est en annexe B (Figure B.1).



## **2.8 Détermination de la concentration des phénols solubles**

La quantité de phénols solubles a été déterminée selon la méthode modifiée de Bray et Thorpe (1954). Deux cents mg de matériel lyophilisé ont été moulus et solubilisés dans 10 ml de méthanol à l'aide d'un mortier et d'un pilon. Le mélange a été incubé une heure à 65°C (bain: Techne Trempelette TE-8A, Refrigerated Bath RB-5), puis centrifugé 5 minutes à 10 320 g. Le surnageant a été filtré à l'aide d'un papier filtre Whatman No. 1 et 0.1 ml de cet extrait a été mélangé à 1 ml de réactif Folin-Ciocalteu (l'extrait a été remplacé par du méthanol pour faire le zéro). Après 10 minutes d'incubation à la température de la pièce, l'absorbance à 800 nm a été lue (spectrophotomètre Pharmacia Biotech Novaspec II). Les résultats ont été calculés à partir de la courbe étalon faite avec des concentrations connues de catéchol (voir l'annexe B, Figure B.2). Cette réaction colorimétrique étant seulement efficace avec les diphénols conjugués, le catéchol a été choisi pour faire la courbe étalon puisqu'il répondait à cette condition (Dr G. Guillet, comm. pers.). L'acide férulique n'a pas été utilisé, bien que ce soit un phénol caractéristique du maïs, car il ne répond pas à ce critère. Des échantillons des parties aériennes ont principalement été analysés pour cette partie puisque les résultats racinaires nécessitaient plus de matériel que disponible. Alors, seulement les racines de la quatrième semaine ont été utilisées pour cette analyse.

## **2.9 Détermination de l'activité de la peroxydase**

L'activité de la peroxydase a été déterminée selon la méthode modifiée de MacIsaac (1997). Sur la glace, 200 mg de racines lyophilisées ont été moulues à

l'aide d'un mortier et d'un pilon. Ce matériel réduit en poudre a été homogénéisé dans 10 ml de Tris-HCl, pH 7.2, contenant 1.0 mM de DTT et 50 mg de PVP. Cette solution a été centrifugée à 10320 g, 20 minutes à 4°C. Par la suite, le surnageant a été filtré à l'aide d'un papier filtre Whatman No. 1. Cet extrait purifié a été ajouté au tampon d'essai comprenant 0.1 M d'acétate de Na, pH 4.4, 0.1 mM d'acide férulique (Sigma) et 0.1 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. À partir du moment où l'extrait était ajouté (temps=0), le changement en absorbance à 310 nm était suivi pendant une minute avec un spectrophotomètre Beckman DU 62 pourvu d'un programme cinétique. L'activité de la peroxydase a été calculée pour les 15 premières secondes de la réaction, car c'est à ce moment que le taux de réaction était le plus linéaire.

## **2.10 Extraction des acides hydroxamiques**

Le processus d'extraction provient de la méthode de Gutierrez et al. (1982) et a été modifié comme suit. Un gramme de racines fraîches a été homogénéisé à l'aide d'un mortier et d'un pilon dans 3 X 5 ml d'eau distillée. Cette solution a été incubée à l'obscurité, toute la nuit à 25°C. Le lendemain, la solution a été filtrée à l'aide de quatre épaisseurs de coton-fromage, puis son pH ajusté à 2 avec une solution de HCl 1M. Pour éliminer les protéines, cette solution a été chauffée une minute à 65°C, puis refroidie dans un bain d'eau glacée pendant dix minutes, avant de la filtrer de nouveau avec un papier filtre Whatman No. 42 dans un entonnoir Büchner. Ce filtrat a été extrait avec 2 X 10 ml d'acétate d'éthyle. La phase aqueuse a été jetée et les phases organiques concentrées ont été évaporées à sec sous vacuum à 40°C. La mise à sec complète a été effectuée à l'aide d'un petit jet d'azote. Ensuite, le résidu a été resuspendu dans 2 ml d'acétate d'éthyle

(pour CLHP) puis rangé dans le congélateur, en attendant son analyse au CLHP. Avant l'analyse, les extraits ont été évaporés sous vide et complètement asséchés à l'aide d'un jet d'azote, puis redissouts dans 1 ml de méthanol de qualité CLHP. Avant l'injection dans l'appareil, tous les extraits ont été filtrés avec un filtre de nylon millipore de 0.5 micron à l'aide d'une seringue Luer lock de 2.5 ml.

Pour l'analyse CLHP des acides hydroxamiques, un appareil Beckman 168 System Gold HPLC ayant un détecteur 168, un module de solvant 126 et un auto-échantillonneur 502 ont été utilisés au laboratoire de Dr J.T. Arnason, Université d'Ottawa. Une colonne "Superspher® 100 RP-18 encapped" mesurant 125 mm X 4 mm, dont le diamètre des particules est de 5 µm a été utilisée pour les séparations. L'auto-échantillonneur avait été programmé pour injecter des parties aliquotes d'extraits de 5 µl à la fois dans la colonne. Les solvants utilisés étaient (A) le méthanol de qualité CLHP et (B) 20 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 2.4, ayant un débit d'un ml par minute. Les gradients se succédaient comme suit de 25 à 45% de A en 10 minutes, de 45 à 80% de A en 2 minutes, de 80% de A pendant 3 minutes, de 80 à 25% de A en 2 minutes et 25% de A pendant 8 minutes. Les absorbances ont été prises à 210 nm et 264 nm (Figure 2.1). L'identification du DIMBOA et du MBOA a été faite à partir des temps de rétention et des spectres UV des composés standards purs. Les temps de rétention du DIMBOA et du MBOA sont approximativement de 6.62 minutes et de 9.24 minutes, respectivement (Annexe C). Le standard de DIMBOA a été synthétisé par Atkinson (1989) et le MBOA provenait de Sigma.

Suite aux résultats de l'analyse statistique des données à 264 nm et vu que la concentration en DIMBOA et MBOA des racines à une longueur d'onde de 210 nm était très variable, aucune analyse des données à 210 nm n'a été présentée.

De plus, ces résultats ont pu être faussés par le fait que le méthanol, utilisé comme solvant, commence à absorber la lumière à 210 nm.

## **2.11 Analyses statistiques**

Toutes les données ont été analysées selon une analyse de variance à trois facteurs pour les résultats de la première expérience (mycorhizes, cultivar et semaine) et à deux facteurs pour les résultats de la deuxième expérience (mycorhizes et semaine). Lorsque les facteurs principaux étaient significatifs, le test de Tukey-Kramer HSD était effectué pour déterminer les traitements significativement différents. Lorsque les interactions étaient significatives, la détermination des facteurs significativement différents était faite par des tests *t* de Student, corrigés par l'ajustement de Bonferroni. Cette méthode consiste à diviser la valeur de  $\alpha$  utilisée comme seuil pour déterminer qu'un effet est significatif (ici j'ai utilisé  $\alpha = 0.05$ ) par le nombre de tests indépendents pour déterminer les effets significatifs. Cette méthode est utilisée pour diminuer la probabilité d'une erreur de type I: lorsqu'une vraie hypothèse nulle est rejetée (Sokal et Rohlf 1995). Pour la première expérience en serre, chaque traitement était répliqué quatre fois, tandis que pour la deuxième expérience, chaque traitement était répliqué huit fois, sauf pour les analyses d'acides hydroxamiques qui étaient répliquées cinq fois. Toutes les analyses statistiques ont été faites avec le logiciel de statistiques JMP® (SAS Institute, Inc. 1994) pour Macintosh.

## RÉSULTATS

### 3.1 Colonisation mycorhizienne

La colonisation mycorhizienne a été évaluée chez les plants mycorhizés et les plants témoins (Tableau 1). Chez ces derniers, aucune trace de colonisation mycorhizienne n'a été observée, tel que prévu. Chez Pride K127 (PRI), la colonisation mycorhizienne (17%) s'est avérée beaucoup moins élevée par rapport à ce qui avait été mesuré au champ (53%). Chez Pioneer 3737 (PIO), elle était similaire (10% vs 14%). C'est pourquoi seulement un cultivar (PIO) a été utilisé lors de la deuxième expérience; la colonisation des deux cultivars étant semblable (23-25%). À la deuxième expérience, la colonisation mycorhizienne chez PIO était légèrement inférieure à la première expérience, mais semblable à l'expérience préliminaire.

**Tableau 1** Colonisation mycorhizienne (en pourcentage) des deux cultivars de maïs, obtenue lors d'une étude préliminaire et des deux expériences en serre. Pour la deuxième expérience, seul le cultivar Pioneer 3737 a été utilisé.

<b>Colonisation mycorhizienne (%)</b>	<b>Expérience préliminaire</b>	<b>1<sup>re</sup> expérience</b>	<b>2<sup>e</sup> expérience</b>
Pioneer 3737	10	23	12
Pride K127	17	25	

### **3.2 Paramètres de croissance**

La biomasse des parties aériennes de la première expérience est influencée par le traitement mycorhizien en fonction des semaines, d'après l'ANOVA,  $p=0.0031$  (Tableau 2). Par contre, aucune semaine ne s'est avérée significativement différente quant à l'effet du traitement mycorhizien suite aux tests t de Student (Annexe D, Tableau D.1). À la figure 3.1, on observe que la biomasse des parties aériennes augmente au cours des semaines, mais il n'y a pas de différence significative entre les différents traitements.

L'analyse de la biomasse des racines de la première expérience indique la présence d'une interaction significative entre les semaines et les cultivars ( $p = 0.001$ ) (Tableau 2). Le cultivar a un effet significativement différent aux semaines 2 et 3 ( $p=0.0001$  et  $p=0.0001$ , Annexe D, Tableau D.2). Qu'il soit mycorhizé ou non, le cultivar PIO a une biomasse racinaire plus élevée que celle de PRI à ces deux semaines (Figure 3.2).

Les résultats sont semblables pour l'ANOVA de la biomasse totale des plants de la première expérience (Tableau 2). Deux interactions sont significatives: semaine et mycorhizes ainsi que semaine et cultivar. À la deuxième et à la troisième semaines, on observe une différence significative pour le cultivar ( $p<0.0001$  et  $p<0.0001$ ), où PIO a une biomasse totale plus élevée que celle de PRI (Figure 3.3). Pour ce qui est de l'interaction semaines et mycorhizes, le traitement mycorhizien influence significativement la biomasse totale des plants à la cinquième semaine, suite aux tests t de Student ( $p = 0.0035$ , Annexe D, Tableau D.3). Les plants témoins ont une biomasse totale plus élevée que les plants mycorhizés.

Pour la deuxième expérience, l'ANOVA de la biomasse aérienne indique une interaction significative entre les semaines et le traitement mycorhizien ( $p = 0.0048$ ) (Tableau 3). À la septième semaine, les plants témoins ont une biomasse aérienne plus élevée que les plants mycorhizés ( $p = 0.0128$ , Annexe D, Tableau D.4) et (Figure 3.4).

La biomasse racinaire des plants de la seconde expérience est influencée différemment par le traitement mycorhizien en fonction des semaines ( $p = 0.0281$ ) (Tableau 3). Comme dans le cas des parties aériennes, les plants témoins de la septième semaine (Annexe D, Tableau D.5) tendent à avoir une biomasse racinaire plus élevée que les plants mycorhizés (Figure 3.5).

Il n'est donc pas surprenant que l'ANOVA de la biomasse totale montre aussi une interaction entre les semaines et le traitement mycorhizien (Tableau 3). Les plants témoins de la septième semaine ont une biomasse totale plus élevée que les plants mycorhizés chez PIO ( $p = 0.0129$ , Annexe D, Tableau D.6 et Figure 3.6).

La hauteur des plants de la première expérience varie selon les semaines, le traitement mycorhizien et le cultivar ( $p = 0.0005$ ) (Tableau 4). À la figure 3.7, on observe que la taille des plants augmente avec le temps et l'effet de traitement mycorhizien varie en fonction des semaines et du cultivar.



**L'effet du traitement mycorhizien sur la hauteur des plants de la deuxième expérience varie selon les différentes semaines de croissance (Tableau 5). Les plants témoins de PIO sont plus hauts que les plants mycorhizés à la troisième et à la cinquième semaines ( $p = 0.0122$  et  $p < 0.0001$ , Annexe D, Tableau D.7) (Figure 3.8).**

**Tableau 2** Analyse de variance à trois facteurs pour la biomasse des parties aériennes, la biomasse racinaire et la biomasse totale des plants de la première expérience.

Source de variation	dl	Aérienne		Racinaire		Totale	
		F	p	F	p	F	p
Semaine	6	739.09	0.0000	137.71	0.0000	521.05	0.0000
Mycorhizes	1	9.86	0.0022	1.01	0.3178	9.87	0.0022
Cultivar	1	8.17	0.0052	18.09	0.0000	11.43	0.0010
Semaine*Mycorhizes	6	3.56	0.0031	0.24	0.9608	3.92	0.0015
Semaine*Cultivar	6	1.09	0.3716	6.11	0.0000	2.18	0.0508
Mycorhizes*Cultivar	1	1.91	0.1696	0.95	0.3327	0.59	0.4413
Semaine*Mycorhize*Cultivar	6	0.40	0.8752	1.19	0.3205	0.36	0.9042

dl = degrés de liberté, F = distribution de Fischer, p = probabilité

parties aériennes:  $R^2 = 0.98$ ,  $F_{(27, 98)} = 166.05$

racinaire:  $R^2 = 0.90$ ,  $F_{(27, 96)} = 33.39$

totale:  $R^2 = 0.97$ ,  $F_{(27, 98)} = 117.95$

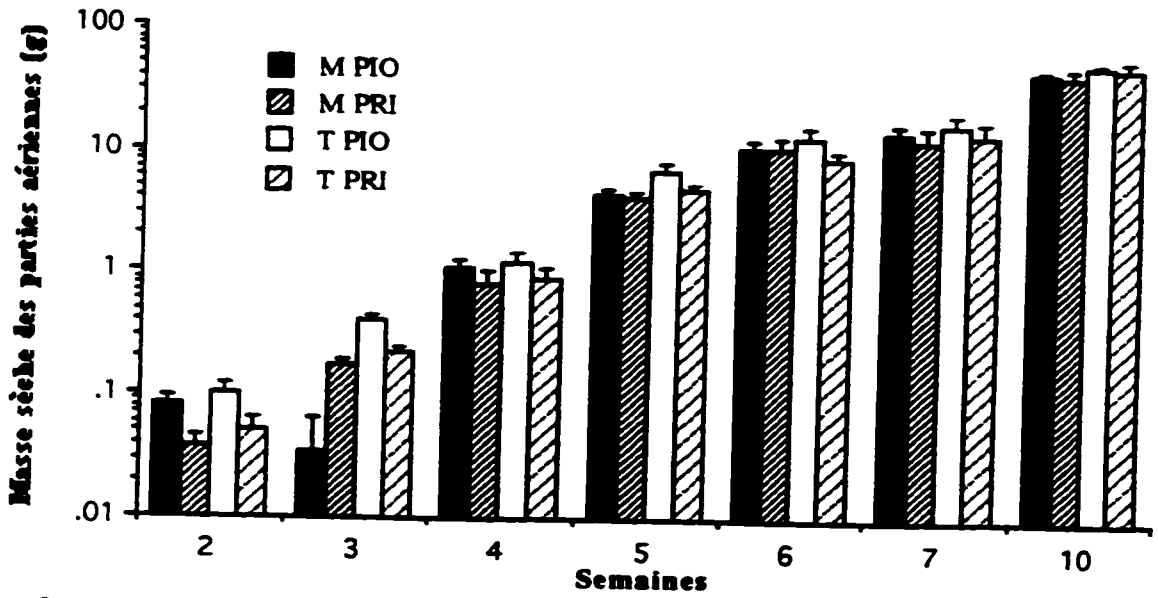


Figure 3.1 Masse sèche des parties aériennes (g) des plants mycorhizés (M) et témoins (T) des deux cultivars pour la première expérience. L'écart-type est aussi représenté (n=4). L'échelle de l'axe des y est logarithmique.

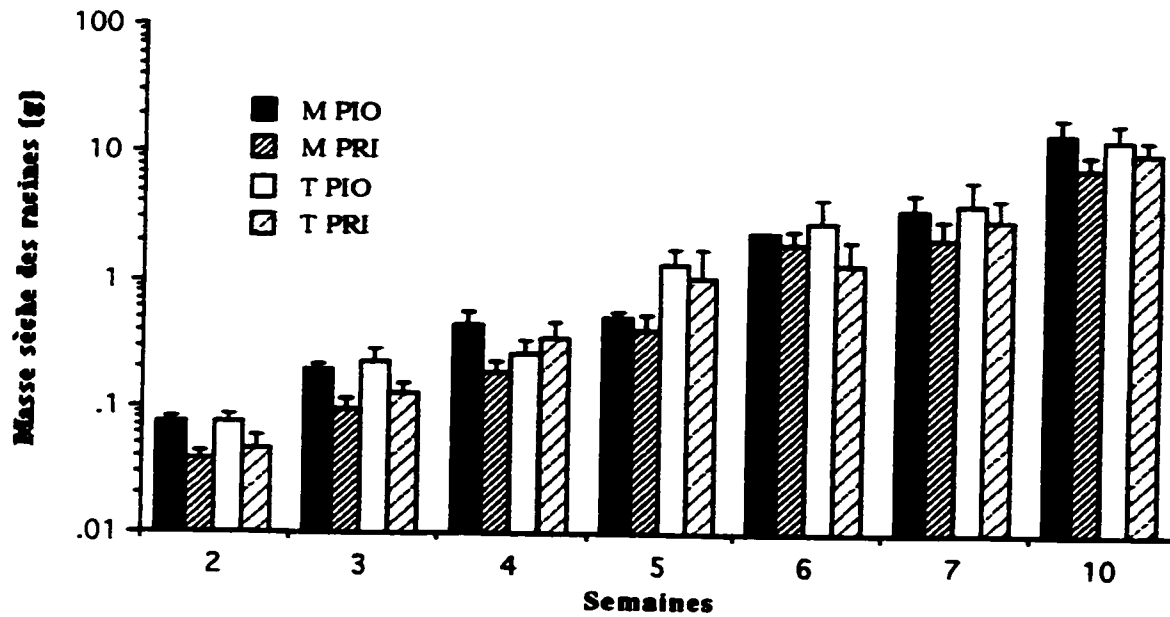


Figure 3.2 Masse sèche des racines (g) des plants mycorhizés (M) et témoins (T) des deux cultivars de la première expérience. L'écart-type est aussi représenté (n=4). L'échelle de l'axe des y est logarithmique.

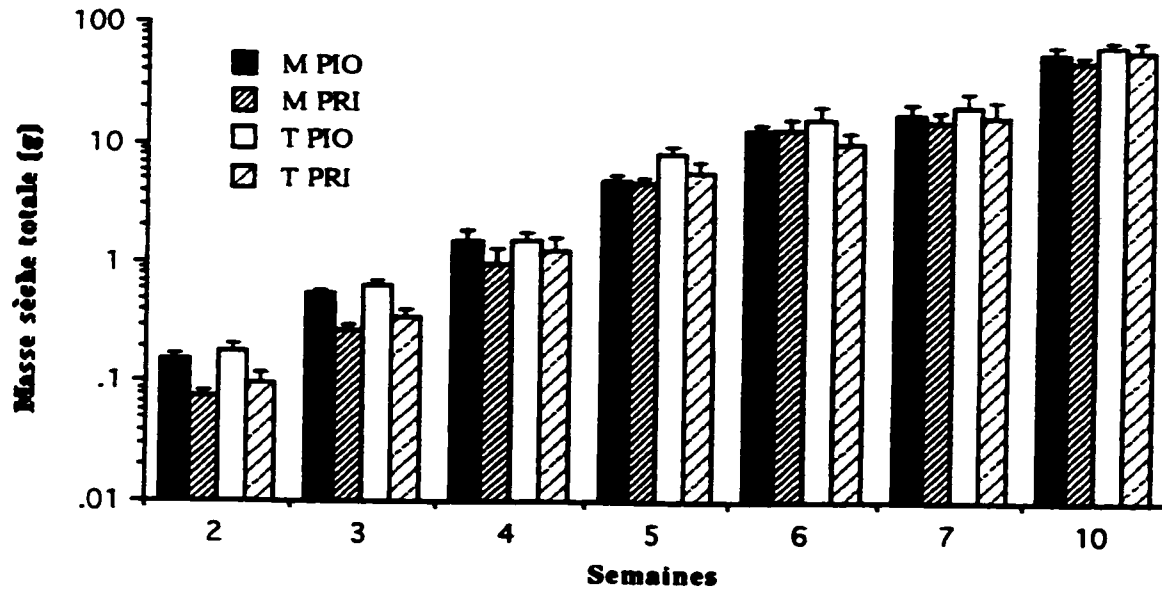


Figure 3.3 Masse sèche totale (g) des plants mycorhizés (M) et témoins (T) des deux cultivars pour la première expérience. L'écart-type est aussi représenté (n=4). L'échelle de l'axe des y est logarithmique.

**Tableau 3** Analyse de variance à deux facteurs pour la biomasse des parties aériennes, la biomasse racinaire et la biomasse totale des plants de la deuxième expérience.

Source de variation	dl	Aérienne		Racinaire		Totale	
		F	p	F	p	F	p
Semaine	2	275.17	0.0000	282.39	0.0000	292.23	0.0000
Mycorhizes	1	9.01	0.0041	2.23	0.1410	8.22	0.0060
Semaine*Mycorhizes	2	5.94	0.0048	3.82	0.0281	5.98	0.0046

dl = degrés de liberté, F = distribution de Fischer, p = probabilité

parties aériennes:  $R^2 = 0.92$ ,  $F_{(5, 52)} = 114.43$

racinaire:  $R^2 = 0.92$ ,  $F_{(5, 53)} = 114.93$

totale:  $R^2 = 0.92$ ,  $F_{(5, 52)} = 121.15$

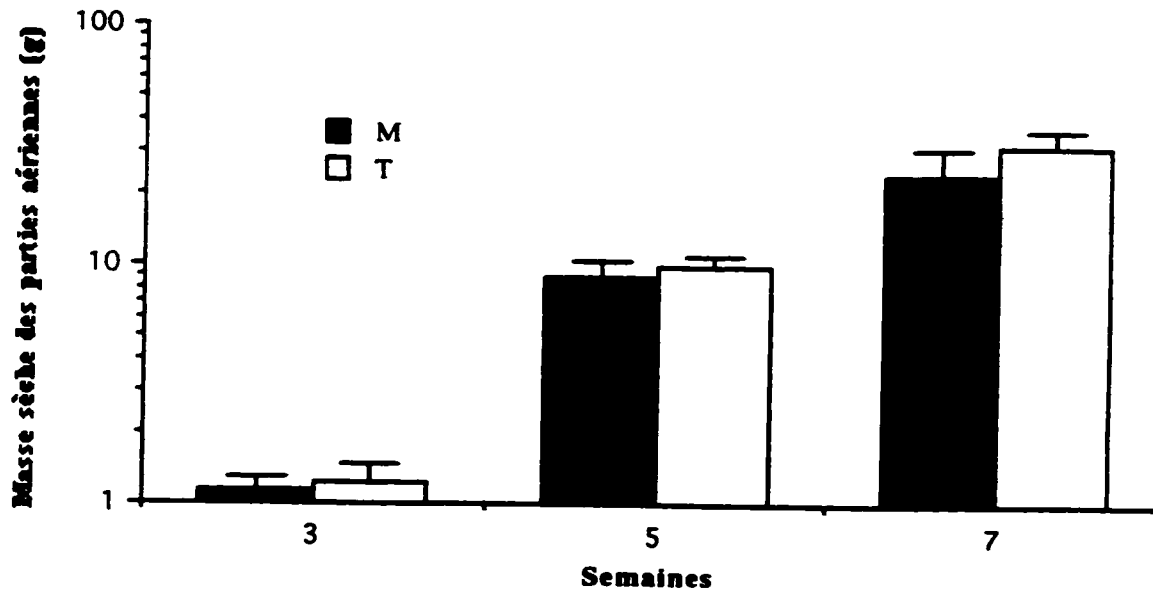


Figure 3.4 Masse sèche des parties aériennes (g) des plants de PIO mycorhizés (M) et témoins (T) de la deuxième expérience. L'écart-type est aussi représenté (n=10). L'échelle de l'axe des y est logarithmique.

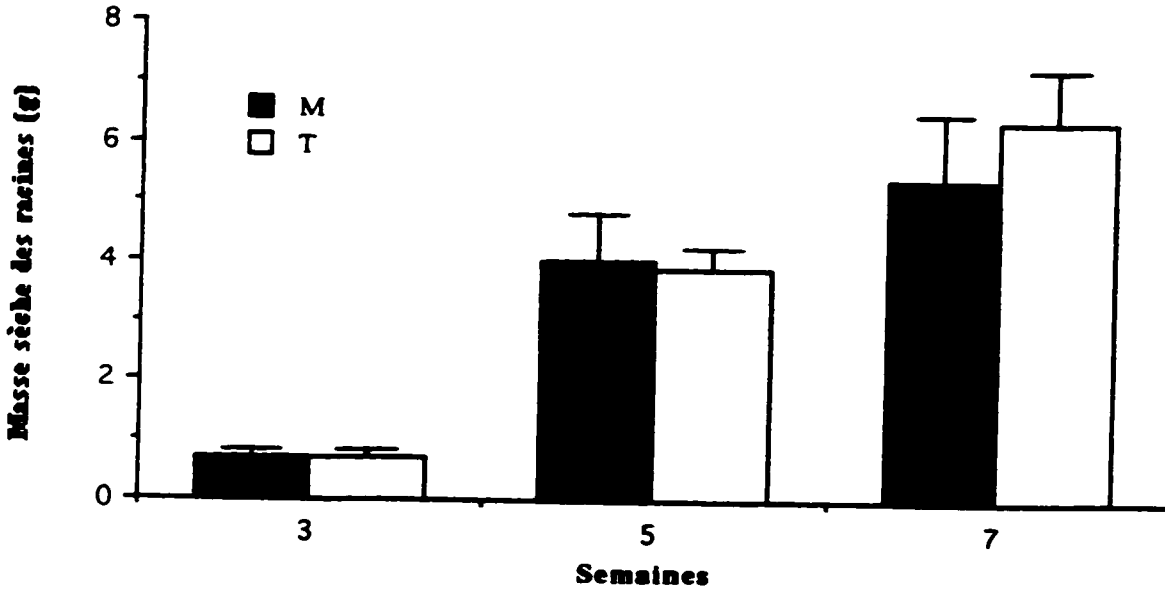


Figure 3.5 Masse sèche des racines (g) des plants de P10 mycorhizés (M) et témoins (T) de la deuxième expérience. L'écart-type est aussi représenté (n=10).



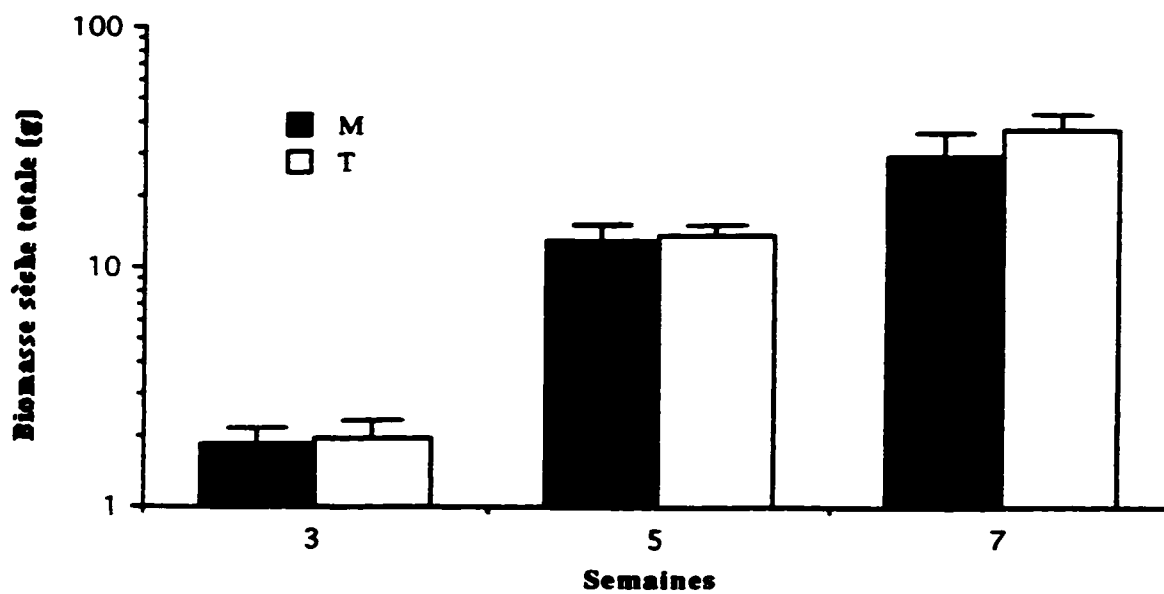


Figure 3.6 Biomasse sèche totale (g) des plants de PIO mycorhizés (M) et témoins (T) de la deuxième expérience. L'écart-type est aussi représenté (n=10). L'échelle de l'axe des y est logarithmique.

**Tableau 4** Analyse de variance à trois facteurs pour la hauteur des plants de la première expérience.

<b>Source de variation</b>	<b>dl</b>	<b>F</b>	<b>P</b>
Semaine	6	740.18	0.0000
Mycorhizes	1	13.71	0.0004
Cultivar	1	7.07	0.0092
Semaine*Mycorhizes	6	1.67	0.1364
Semaine*Cultivar	6	9.67	0.0000
Mycorhizes*Cultivar	1	7.23	0.0084
Semaine*Mycorhize*Cultivar	6	4.48	0.0005

dl = degrés de liberté, F = distribution de Fischer, p = probabilité

$R^2 = 0.98$ ,  $F_{(27, 98)} = 169.23$

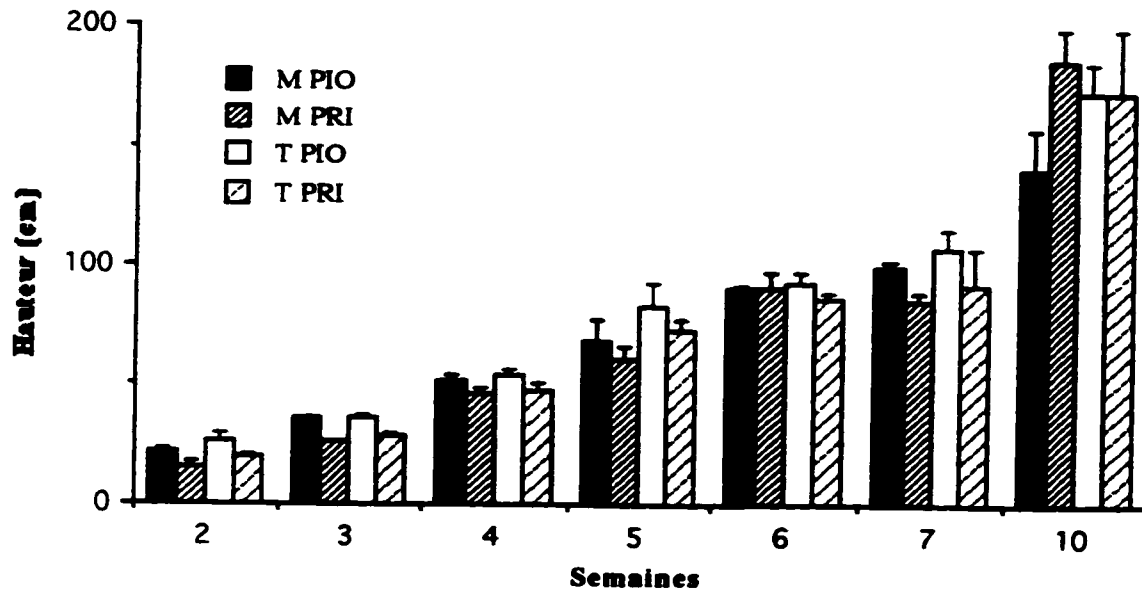


Figure 3.7 Hauteur (cm) des plants mycorhizés (M) et témoins (T) des deux cultivars de la première expérience. L'écart-type est aussi représenté (n=4).

**Tableau 5** Analyse de variance à deux facteurs pour la hauteur des plants de la deuxième expérience.

<b>Source de variation</b>	<b>dl</b>	<b>F</b>	<b>P</b>
Semaine	2	656.07	0.0000
Mycorhizes	1	16.11	0.0002
Semaine*Mycorhizes	2	3.91	0.0261

dl = degrés de liberté, F = distribution de Fischer, p = probabilité

$R^2 = 0.96$ ,  $F_{(5, 53)} = 267.29$

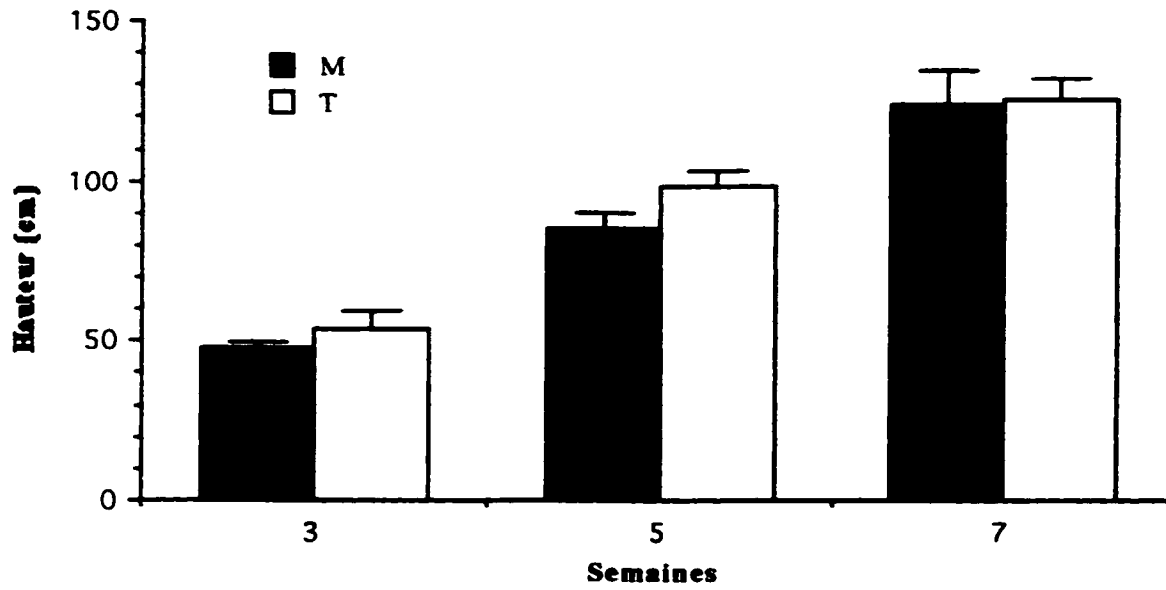


Figure 3.8 Hauteur (cm) des plants de PIO mycorrhizés (M) et témoins (T) de la deuxième expérience. L'écart-type est aussi représenté (n=10).

### **3.3 Concentration en protéines**

L'ANOVA sur la concentration en protéines des feuilles lors de la première expérience indique une triple interaction: Semaine X Mycorhizes X Cultivar ( $p=0.0014$ ) (Tableau 6). La concentration en protéines diminue à la 7<sup>e</sup> semaine et l'effet du traitement mycorhizien et du cultivar varie avec les semaines (Figure 3.9).

Pour ce qui est des racines, l'ANOVA indique des interactions du cultivar et du traitement mycorhizien avec les semaines ( $p = 0.0001$  et  $p = 0.0001$ ) (Tableau 6). Les plants mycorhizés ont une concentration en protéines plus élevée que les plants témoins aux semaines 4 et 5 ( $p = 0.003$  et  $p = 0.0027$ , Annexe D, Tableau D.8) (Figure 3.10). Le cultivar a un effet significatif à la troisième semaine seulement ( $p=0.0004$ , Annexe D, Tableau D.8), PRI ayant une concentration plus élevée en protéines que PIO mycorhizé ou non (Figure 3.10).

Suite à l'ANOVA, seules les semaines ont un effet significatif sur la concentration en protéines des feuilles de la seconde expérience ( $p = 0.0001$ ) (Tableau 7). Le test Tukey-Kramer indique que la septième semaine diffère des semaines 3 et 5 qui sont semblables (Annexe D, Tableau D.9). La concentration en protéines des feuilles de PIO est plus basse à la septième semaine qu'aux semaines 3 et 5 (Figure 3.11). La même analyse pour les racines (Tableau 7) révèle que la mycorhization augmente significativement la concentration en protéines chez PIO. Les concentrations moyennes en protéines diminuent avec le temps, sauf chez les plants témoins à la cinquième semaine (Figure 3.12).

**Tableau 6** Analyse de variance à trois facteurs pour la concentration en protéines des feuilles et des racines des plants de la première expérience.

Source de variation	Feuilles			Racines		
	dl	F	p	dl	F	p
Semaine	2	134.23	0.0000	6	37.07	0.0000
Mycorhizes	1	3.14	0.0850	1	2.07	0.1543
Cultivar	1	0.85	0.3629	1	29.22	0.0000
Semaine*Mycorhizes	2	0.69	0.5091	6	6.07	0.0000
Semaine*Cultivar	2	9.46	0.0005	6	5.19	0.0001
Mycorhizes*Cultivar	1	6.94	0.0124	1	1.54	0.2184
Semaine*Mycorhize*Cultivar	2	7.98	0.0014	6	0.70	0.6473

dl = degrés de liberté, F = distribution de Fischer, p = probabilité

feuilles:  $R^2 = 0.90$ ,  $F_{(11,36)} = 28.70$

racines:  $R^2 = 0.81$ ,  $F_{(27, 79)} = 12.12$

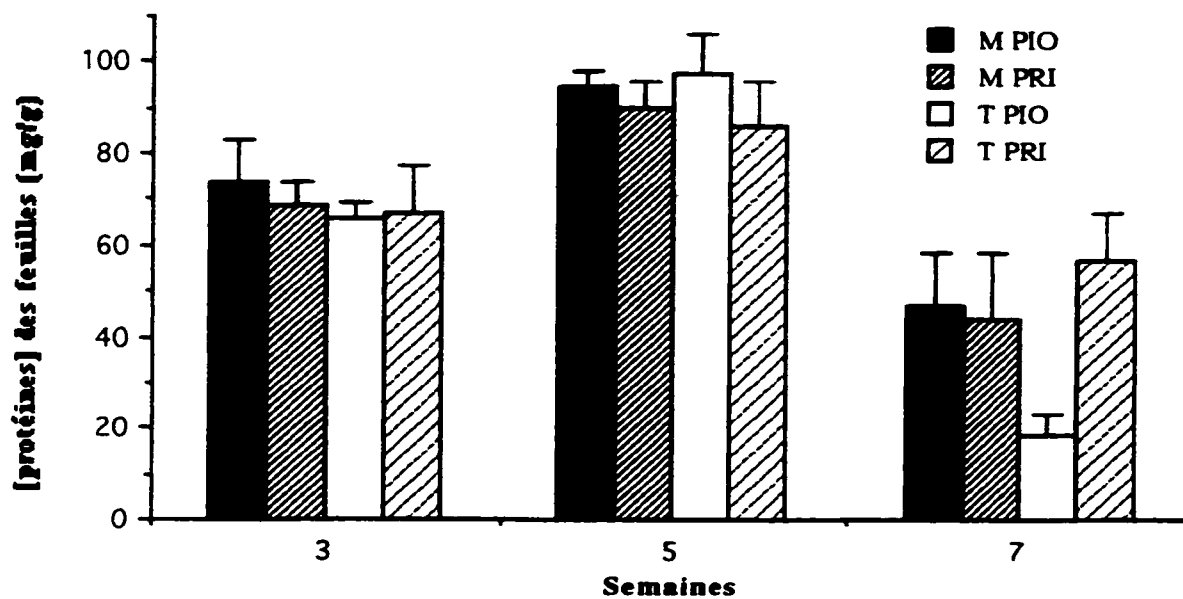


Figure 3.9 Concentration en protéines (mg de protéines par g de matière sèche) des feuilles des plants mycorhizés (M) et témoins (T) des deux cultivars pour la première expérience. L'écart-type est aussi représenté (n=4).



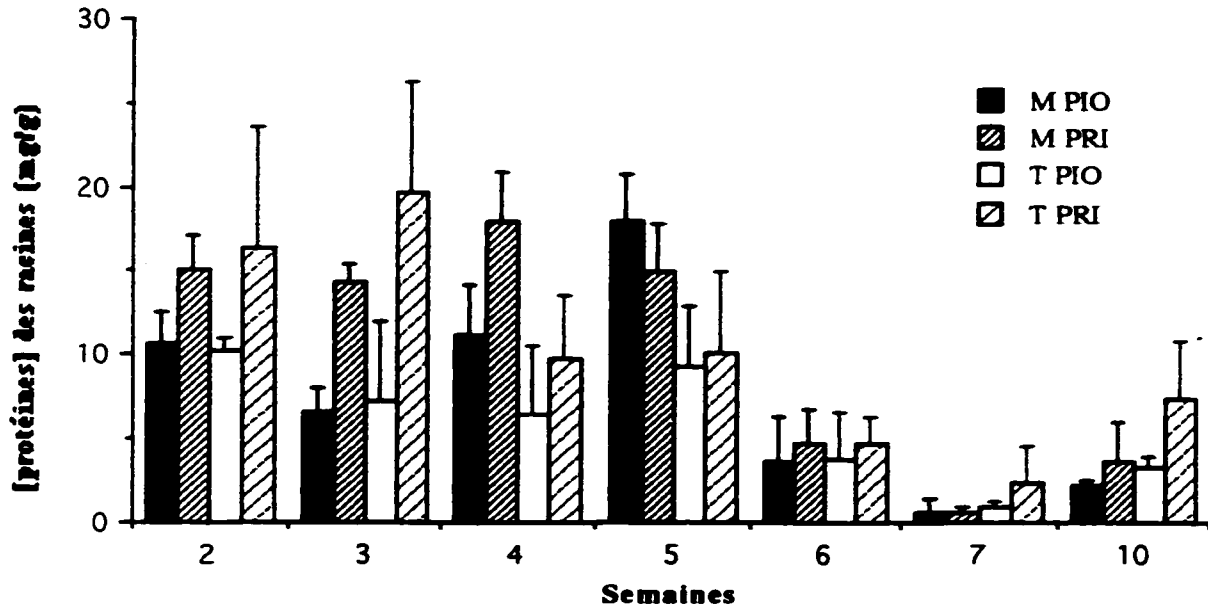


Figure 3.10 Concentration en protéines (mg de protéines par g de matière sèche) des racines des plants mycorhizés (M) et témoins (T) des deux cultivars, pour la première expérience. L'écart-type est aussi représenté (n=4).

**Tableau 7** Analyse de variance à deux facteurs pour la concentration en protéines des feuilles et des racines des plants de la deuxième expérience.

Source de variation	Feuilles			Racines	
	dl	F	p	F	p
Semaine	2	53.87	0.0000	2.69	0.0794
Mycorhizes	1	0.01	0.9345	13.79	0.0006
Semaine*Mycorhizes	2	0.49	0.6128	2.70	0.0789

dl = degrés de liberté, F = distribution de Fischer, p = probabilité

feuilles:  $R^2 = 0.72$ ,  $F_{(5, 42)} = 21.75$

racines:  $R^2 = 0.37$ ,  $F_{(5, 42)} = 4.92$

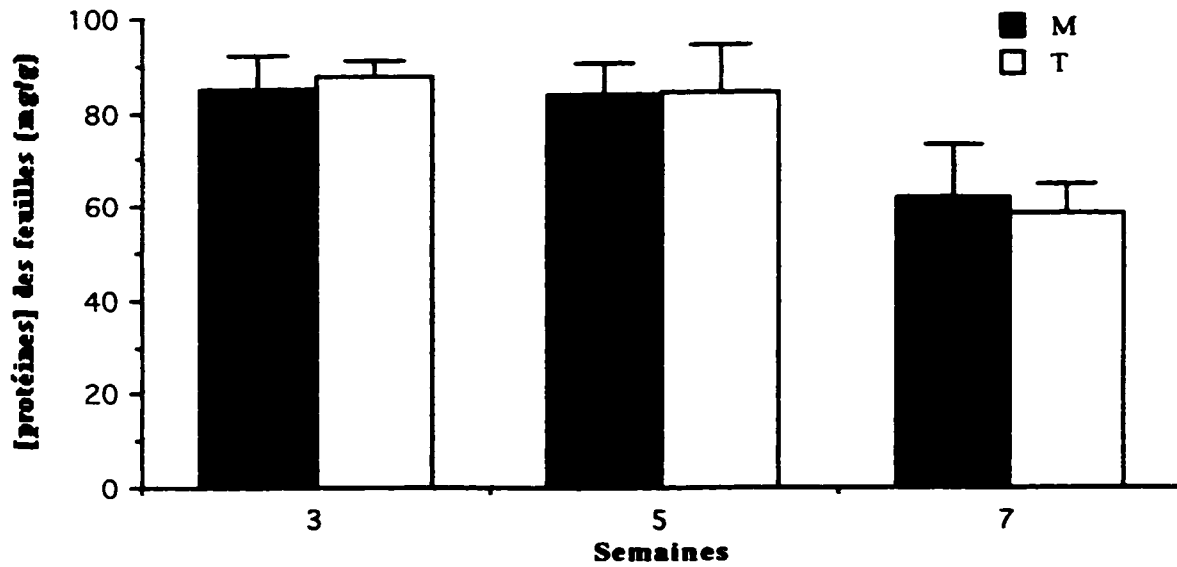


Figure 3.11 Concentration en protéines (mg de protéines par g de matière sèche) des feuilles des plants de PIO mycorrhizés (M) et témoins (T) pour la deuxième expérience. L'écart-type est aussi représenté (n=8).

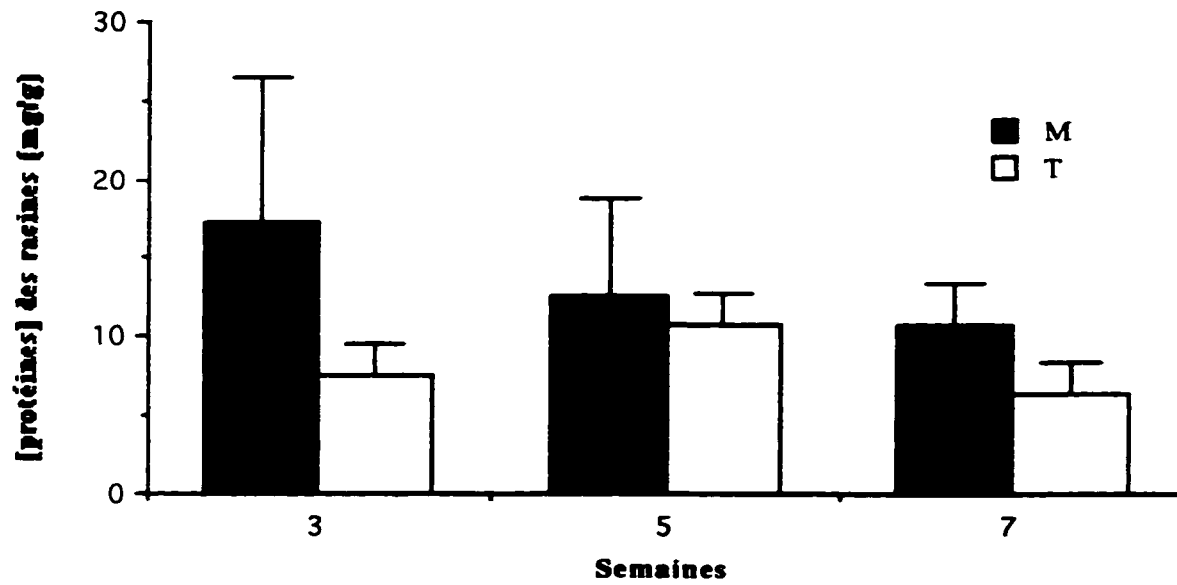


Figure 3.12 Concentration en protéines (mg de protéines par g de matière sèche) des racines des plants de PIO mycorhizés (M) et témoins (T) pour la deuxième expérience. L'écart-type est aussi représenté (n=8).

### **3.4 Activité de la PAL**

L'interaction entre les semaines et le traitement mycorhizien est significative selon l'ANOVA pour l'activité de la PAL de la première expérience (Tableau 8). Le traitement mycorhizien a un effet marginalement significatif aux semaines 5 et 7 selon les tests t de Student ( $p=0.0083$  et  $p=0.0085$ , Annexe D, Tableau D.10). Les plants mycorhizés tendent à avoir une activité enzymatique plus élevée que les plants témoins à la cinquième semaine, et l'inverse se produit à la septième semaine (Figure 3.13).

Pour la deuxième expérience, seules les semaines influencent significativement l'activité de la PAL (Tableau 9). La septième semaine diffère significativement des semaines 3 et 5 qui sont semblables, d'après le test de Tukey-Kramer (Annexe D, Tableau D.11). L'activité de la PAL suit les mêmes tendances qu'à la première expérience, elle augmente jusqu'à la cinquième semaine, puis diminue à la septième semaine (Figure 3.14). Par contre, le traitement mycorhizien n'influence pas l'activité enzymatique chez PIO.

**Tableau 8** Analyse de variance à trois facteurs pour l'activité de la PAL des racines des plants de la première expérience.

<b>Source de variation</b>	<b>dl</b>	<b>F</b>	<b>p</b>
Semaine	6	18.08	0.0000
Mycorhizes	1	0.99	0.3212
Cultivar	1	0.49	0.4851
Semaine*Mycorhizes	6	3.40	0.0049
Semaine*Cultivar	6	0.20	0.9756
Mycorhizes*Cultivar	1	0.33	0.5655
Semaine*Mycorhize*Cultivar	6	0.75	0.6134

dl = degrés de liberté, F = distribution de Fischer, p = probabilité

$R^2 = 0.64$ ,  $F_{(27, 78)} = 5.03$

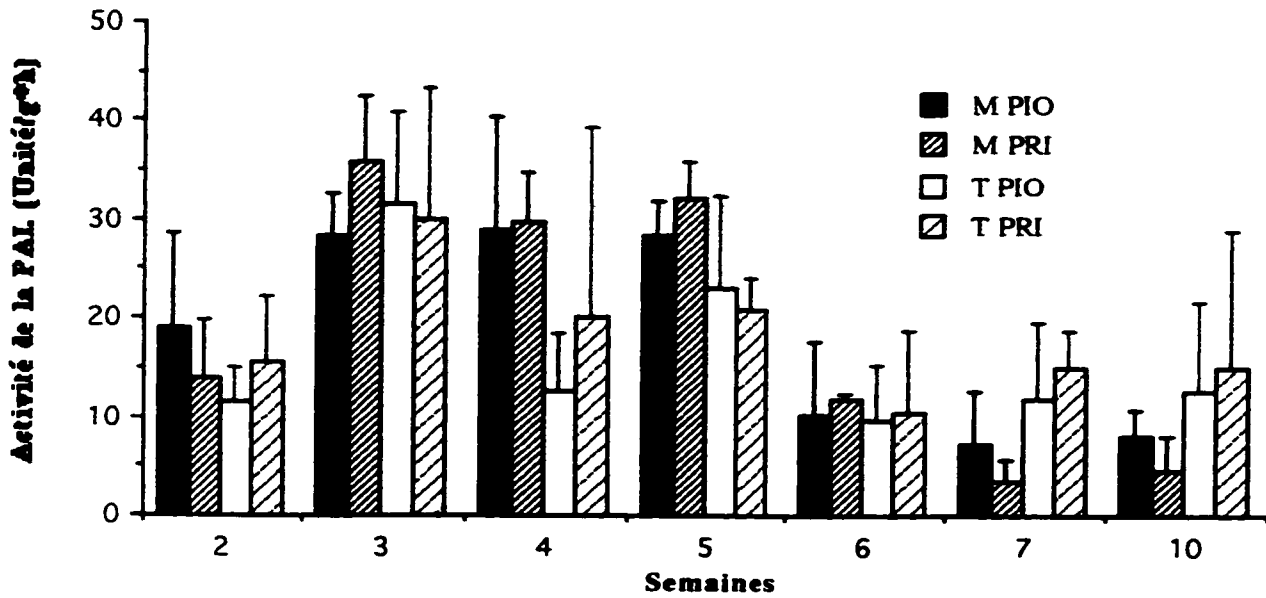


Figure 3.13 Activité de la PAL (Unité/g\*h) des racines des plants mycorhizés (M) et témoins (T) des deux cultivars, pour la première expérience. L'écart-type est aussi représenté (n=4).

**Tableau 9** Analyse de variance à deux facteurs pour l'activité de la PAL des racines des plants de la deuxième expérience.

<b>Source de variation</b>	<b>dl</b>	<b>F</b>	<b>p</b>
Semaine	2	13.43	0.0000
Mycorhizes	1	0.01	0.9154
Semaine*Mycorhizes	2	1.85	0.1695

dl = degrés de liberté, F = distribution de Fischer, p = probabilité

$R^2 = 0.42$ ,  $F_{(5, 42)} = 6.12$



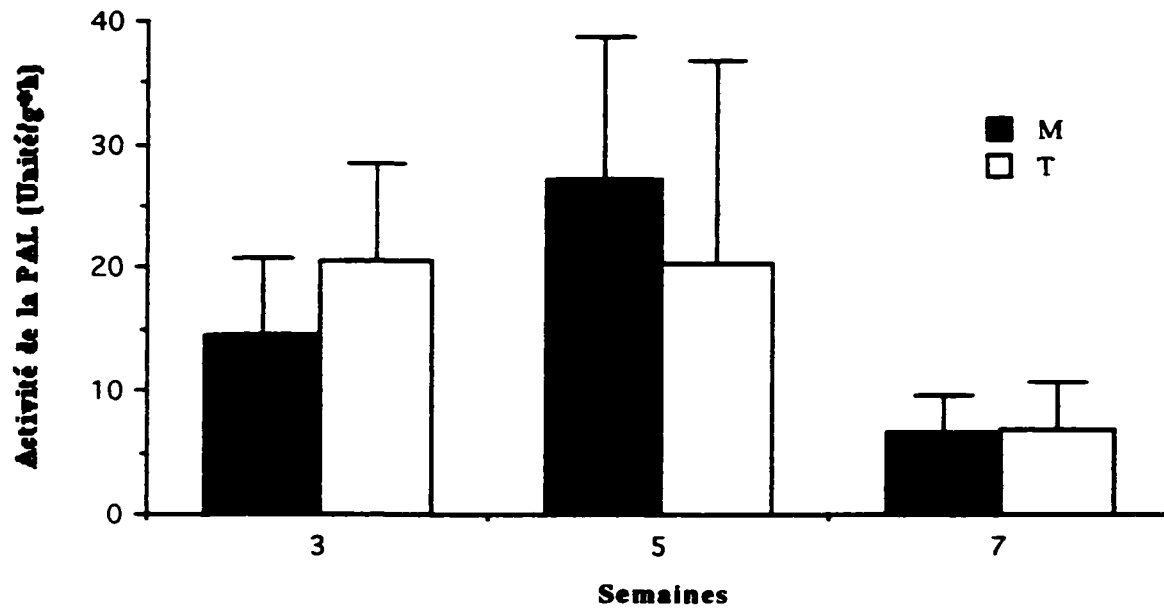


Figure 3.14 Activité de la PAL (Unité/g\*h) des racines des plants de PIO mycorhizés (M) et témoins (T) pour la deuxième expérience. L'écart-type est aussi représenté (n=8).

### **3.5 Activité de la peroxydase**

Le traitement mycorhizien et les semaines ont un effet significatif sur l'activité de la peroxydase à la première expérience ( $p = 0.0001$  et  $p = 0.0002$ ) (Tableau 10). Le test de Tukey-Kramer indique que la septième semaine est significativement différente des semaines 3 et 5 qui sont semblables (Annexe D, Tableau D.12). En effet, à la figure 3.15 on observe une plus grande activité de la peroxydase pour les plants mycorhizés que pour les plants témoins et l'activité de la peroxydase augmente à la 5<sup>e</sup> semaine, puis diminue à la septième semaine.

Les plants de la seconde expérience présentent une activité de la peroxydase ayant des caractéristiques semblables à celle de la première expérience (Tableau 11). Les plants mycorhizés ont une activité enzymatique plus élevée que les plants témoins chez PIO (Figure 3.16). Par contre, seules les semaines 3 et 7 s'avèrent significativement différentes d'après le test de Tukey-Kramer (Annexe D, Tableau D.13).

**Tableau 10** Analyse de variance à trois facteurs pour l'activité de la peroxydase des racines des plants de la première expérience.

<b>Source de variation</b>	<b>dl</b>	<b>F</b>	<b>p</b>
Semaine	2	11.09	0.0002
Mycorhizes	1	18.49	0.0001
Cultivar	1	0.001	0.9741
Semaine*Mycorhizes	2	0.24	0.7908
Semaine*Cultivar	2	1.93	0.1595
Mycorhizes*Cultivar	1	0.05	0.8186
Semaine*Mycorhize*Cultivar	2	0.39	0.6807

dl = degrés de liberté, F = distribution de Fischer, p = probabilité

$R^2 = 0.56$ ,  $F_{(11, 36)} = 4.17$

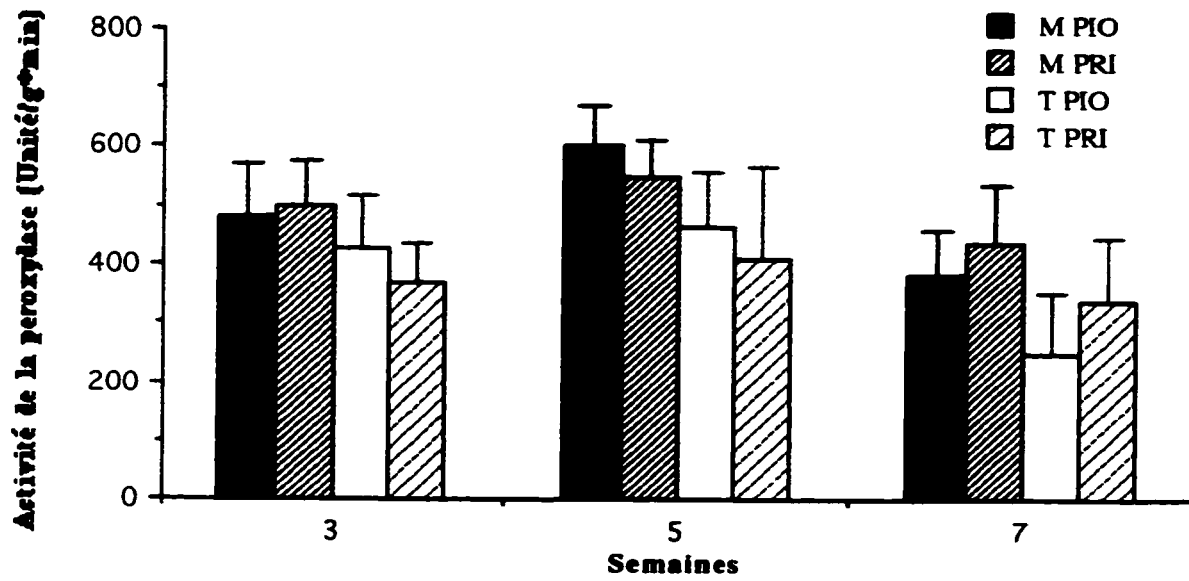


Figure 3.15 Activité de la peroxydase (Unités/g\*min) des racines des plants mycorhizés (M) et témoins (T) des deux cultivars pour la première expérience. L'écart-type est aussi représenté (n=4).

**Tableau 11** Analyse de variance à deux facteurs pour l'activité de la peroxydase des racines des plants de la deuxième expérience.

<b>Source de variation</b>	<b>dl</b>	<b>F</b>	<b>p</b>
Semaine	2	7.01	0.0024
Mycorhizes	1	23.40	0.0000
Semaine*Mycorhizes	2	1.02	0.3697

dl = degrés de liberté, F = distribution de Fischer, p = probabilité

$R^2 = 0.49$ ,  $F_{(5, 41)} = 7.99$

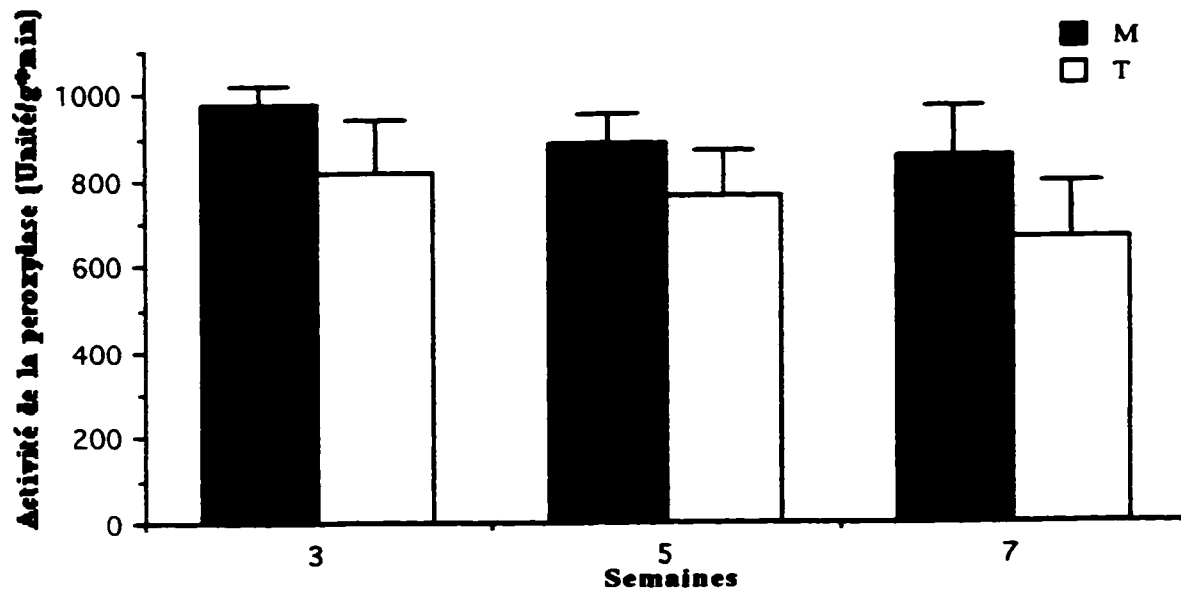


Figure 3.16 Activité de la peroxydase (Unité/g\*min) des racines des plants de PI0 mycorrhizés (M) et témoins (T) de la deuxième expérience. L'écart-type est aussi représenté (n=8).

### **3.6 Phénols solubles**

L'analyse des phénols des feuilles à partir des plants de la première expérience révèle que l'effet du cultivar diffère significativement selon les semaines ( $p = 0.0102$ ) (Tableau 12). Le cultivar a une influence significative sur la concentration en phénols aux semaines 2 et 3 et marginalement significative à la quatrième semaine ( $p = 0.0000$ ,  $p = 0.0078$  et  $p = 0.0082$ , Annexe D, Tableau D.14). Le cultivar PRI a une concentration en phénols solubles plus élevée aux semaines 2 et 3 par comparaison à PIO (Figure 3.17).

L'effet du traitement mycorhizien sur la concentration en phénols solubles des racines de la première expérience n'est pas le même en fonction du cultivar ( $p=0.0384$ ) (Tableau 13). Le cultivar PIO a une concentration en phénols plus élevée lorsqu'il est mycorhizé que lorsqu'il ne l'est pas, alors qu'aucune différence significative n'est obtenue pour PRI (Figure 3.18).

L'ANOVA des phénols solubles des feuilles de la seconde expérience indique un effet différent du traitement mycorhizien selon les semaines (Tableau 14). Dans ce cas-ci, le traitement mycorhizien a un effet significatif à la cinquième semaine et marginalement significatif à la septième semaine ( $p=0.0125$  et  $p=0.0219$ , Annexe D, Tableau D.15). En effet, la concentration en phénols des plants mycorhizés de PIO est plus élevée à la cinquième semaine et plus faible à la septième semaine par comparaison aux plants témoins (Figure 3.19).

**Tableau 12** Analyse de variance à trois facteurs pour la concentration en phénols solubles des feuilles des plants de la première expérience.

<b>Source de variation</b>	<b>dl</b>	<b>F</b>	<b>p</b>
Semaine	6	36.22	0.0000
Mycorhizes	1	0.03	0.8720
Cultivar	1	42.49	0.0000
Semaine*Mycorhizes	6	0.64	0.6998
Semaine*Cultivar	6	3.02	0.0102
Mycorhizes*Cultivar	1	2.18	0.1439
Semaine*Mycorhize*Cultivar	6	1.85	0.0990

dl = degrés de liberté, F = distribution de Fischer, p = probabilité

$R^2 = 0.78$ ,  $F_{(27, 82)} = 11.01$



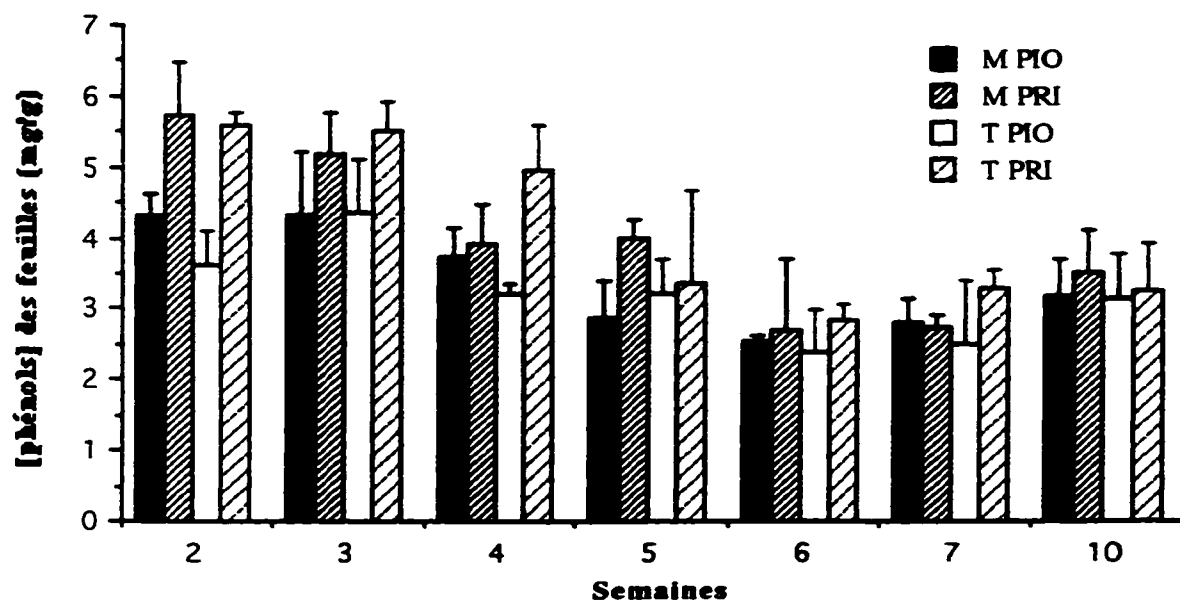


Figure 3.17 Concentration en phénols solubles (mg de phénols par g de matière sèche) des feuilles des plants mycorhizés (M) et témoins (T) des deux cultivars pour la première expérience. L'écart-type est aussi représenté (n=4).

**Tableau 13** Analyse de variance à deux facteurs pour la concentration en phénols solubles des racines des plants de la quatrième semaine de la première expérience.

<b>Source de variation</b>	<b>dl</b>	<b>F</b>	<b>P</b>
Mycorhizes	1	0.0003	0.9869
Cultivar	1	7.74	0.0166
Mycorhizes*Cultivar	1	5.41	0.0384

dl = degrés de liberté, F = distribution de Fischer, p = probabilité

$R^2 = 0.52$ ,  $F(3, 12) = 4.38$

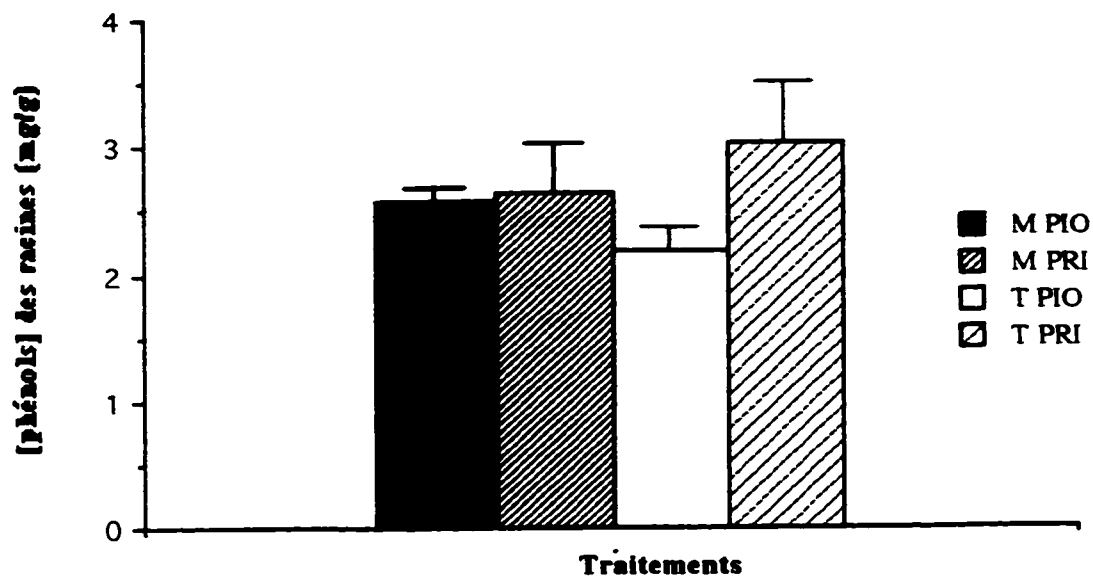


Figure 3.18 Concentration en phénols solubles (mg de phénols par g de matière sèche) des racines des plants mycorhizés (M) et témoins (T) des 2 cultivars à la 4e semaine de la 1re expérience. L'écart-type est aussi représenté (n=4).

**Tableau 14** Analyse de variance à deux facteurs pour la concentration en phénols solubles des feuilles des plants de la deuxième expérience.

<b>Source de variation</b>	<b>dl</b>	<b>F</b>	<b>P</b>
Semaine	2	11.47	0.0001
Mycorhizes	1	0.86	0.3604
Semaine*Mycorhizes	2	5.51	0.0075

dl = degrés de liberté, F = distribution de Fischer, p = probabilité

$R^2 = 0.45$ ,  $F_{(5,42)} = 6.97$

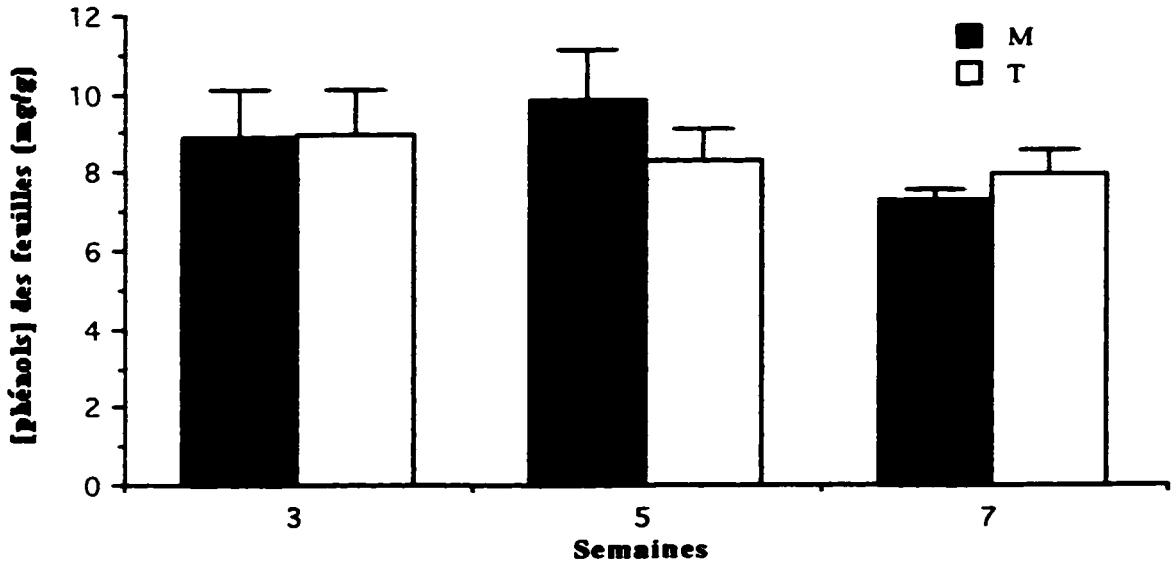


Figure 3.19 Concentration en phénols solubles (mg de phénols par g de matière sèche) des feuilles des plants de PIO mycorhizés (M) et témoins (T) de la deuxième expérience. L'écart-type est aussi représenté (n=8).

### **3.7 Acides hydroxamiques**

L'analyse de variance de la concentration en DIMBOA ne révèle aucune différence significative entre les traitements (Tableau 15). Il en est de même pour les analyses de la concentration en MBOA ainsi que les concentrations additionnées de DIMBOA et MBOA. La concentration en DIMBOA des racines ne varie pas entre les différents traitements (Figure 3.20), ainsi que les concentrations en MBOA (Figure 3.21) et en DIMBOA et MBOA additionnées (Figure 3.22). Cette addition est basée sur le fait qu'une mole de DIMBOA produit une mole de MBOA, après dégradation (Xie et al. 1991).

**Tableau 15** Analyse de variance à deux facteurs pour les concentrations de DIMBOA et de MBOA des racines des plants de la deuxième expérience.

<b>Paramètre</b>	<b>Source de variation</b>	<b>dl</b>	<b>F</b>	<b>p</b>
<b>DIMBOA</b>	<b>Semaine</b>	<b>4</b>	<b>1.67</b>	<b>0.1756</b>
	<b>Mycorhizes</b>	<b>1</b>	<b>1.38</b>	<b>0.2475</b>
	<b>Semaine*Mycorhizes</b>	<b>4</b>	<b>1.04</b>	<b>0.4004</b>
<b>MBOA</b>	<b>Semaine</b>	<b>4</b>	<b>0.37</b>	<b>0.8313</b>
	<b>Mycorhizes</b>	<b>1</b>	<b>0.08</b>	<b>0.7825</b>
	<b>Semaine*Mycorhizes</b>	<b>4</b>	<b>0.58</b>	<b>0.6790</b>
<b>DIMBOA + MBOA</b>	<b>Semaine</b>	<b>4</b>	<b>0.77</b>	<b>0.5522</b>
	<b>Mycorhizes</b>	<b>1</b>	<b>0.44</b>	<b>0.5092</b>
	<b>Semaine*Mycorhizes</b>	<b>4</b>	<b>0.40</b>	<b>0.8070</b>

dl = degrés de liberté, F = distribution de Fischer, p = probabilité

DIMBOA:  $R^2 = 0.23$ ,  $F_{(9, 40)} = 1.36$

MBOA:  $R^2 = 0.09$ ,  $F_{(9, 40)} = 0.43$

DIMBOA et MBOA:  $R^2 = 0.11$ ,  $F_{(9, 40)} = 0.57$

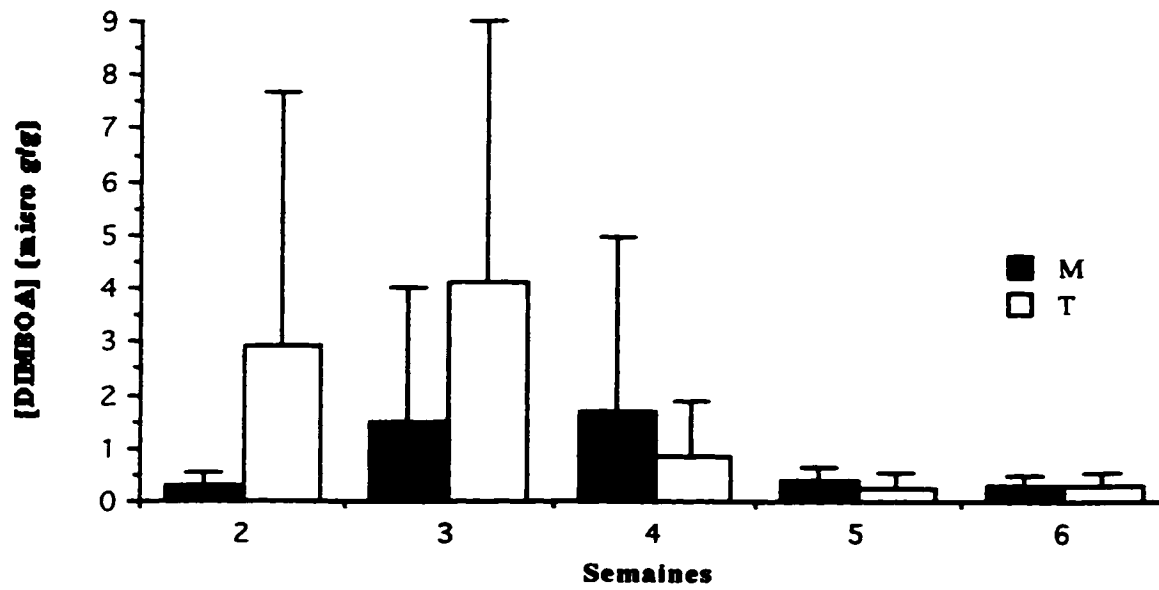


Figure 3.20 Concentration en DIMBOA (micro g par g de matière sèche) des racines des plants de PIO mycorhizés (M) et témoins (T) de la deuxième expérience. L'écart-type est aussi représenté (n=5).



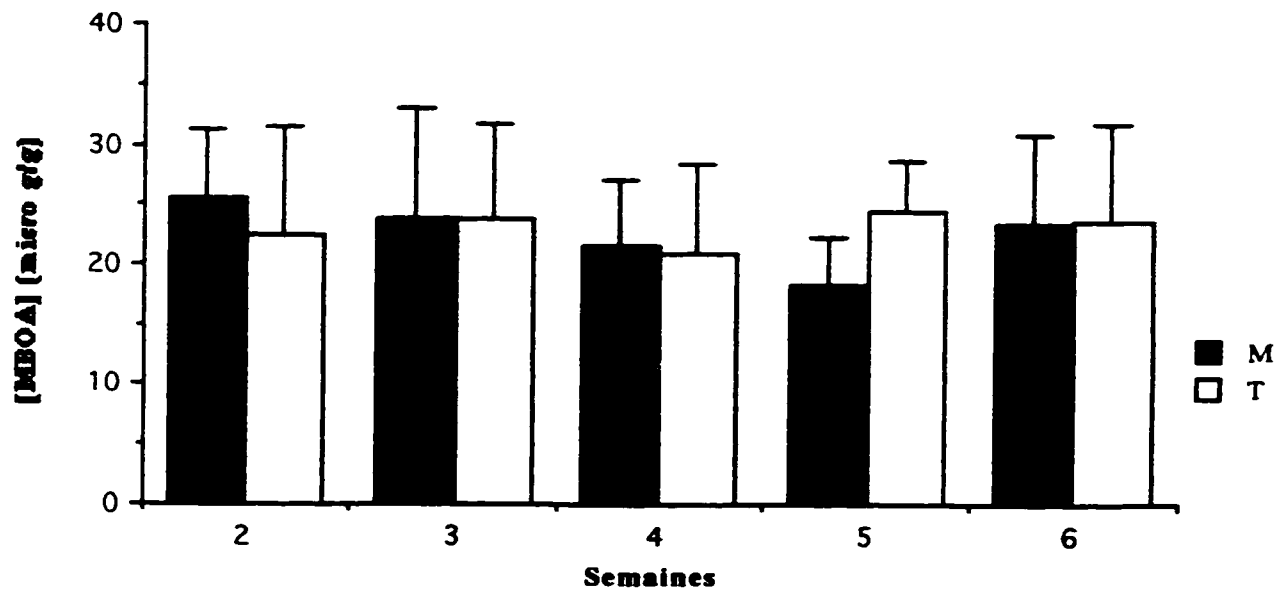


Figure 3.21 Concentration en MBOA (micro g par g de matière sèche) des racines des plants de PIO mycorhizés (M) et témoins (T) de la deuxième expérience. L'écart-type est aussi représenté (n=5).

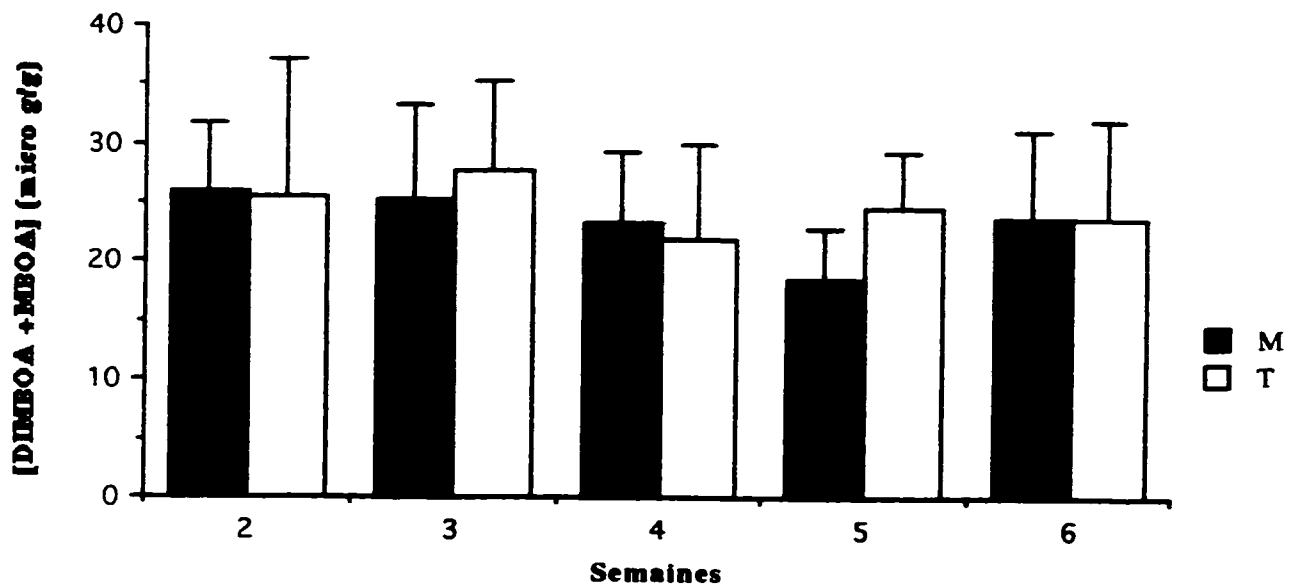


Figure 3.22 Concentration en DIMBOA et MBOA (micro g par g de matière sèche) des racines des plants de PIQ mycorrhizés (M) et témoins (T) de la deuxième expérience. L'écart-type est aussi représenté (n=5).

## DISCUSSION

### 4.1 Colonisation mycorhizienne

Le maïs est reconnu comme ayant un indice de colonisation mycorhizienne relativement élevé, soit aux environs de 70%, ainsi qu'une dépendance mycorhizienne élevée (Plenchette et al. 1983). Une colonisation mycorhizienne d'environ 20% a été obtenue lors des différentes expériences, ce qui est plus faible que la colonisation rapportée pour deux autres cultivars colonisés avec *Glomus intraradices* (Subramanian et al. 1997). Boucher et al. (1999) rapportent, néanmoins, des pourcentages de colonisations du maïs variant entre 26 et 76% pour quatre différentes espèces de *Glomus*. Le type de champignon mycorhizien influence donc l'étendue de la colonisation racinaire. Les différents cultivars de maïs utilisés peuvent influencer la colonisation par le champignon endomycorhizien et être à l'origine de différences (Smith et Read 1997), tout comme les conditions d'expérimentation. En effet, la colonisation mycorhizienne de six différents cultivars de maïs colonisés par *G.intraradices* ou *Gigaspora margarita* varie entre 49 et 68% (Khalil et al. 1994). Le stade de dormance ou l'âge des spores utilisées peuvent aussi influencer le degré de colonisation (Smith et Read 1997). Le pourcentage que j'ai obtenu est tout de même assez élevé pour pouvoir observer certaines différences significatives entre les plants mycorhizés et les plants témoins pour les divers paramètres étudiés.

D'après des expériences antérieures au champ (Dr L. Reid et Dr S. Nelson, comm. pers.), Pioneer 3737 avait une faible mycorhization (14%) et Pride K127, une forte mycorhization (53%). Cependant, la colonisation mycorhizienne des deux cultivars de maïs cultivés en serre s'est avérée presque équivalente, rendant

ainsi la comparaison entre les cultivars moins pertinente. Le but premier de l'utilisation de ces cultivars était de déterminer si les paramètres étudiés étaient influencés par la quantité de structures mycorhiziennes présentes chez la plante hôte. Vu les résultats de la première expérience en serre, un seul cultivar, Pioneer 3737, a été utilisé lors de la deuxième expérience, permettant ainsi l'augmentation du nombre de répétitions pour chaque traitement.

#### **4.2 Paramètres de croissance**

La biomasse des plants de la première expérience n'est pas très influencée par la mycorhization. Nous nous attendions à ce que la biomasse des plants mycorhizés soit plus élevée que celle des plants témoins (Subramanian et al. 1997), du moins lors des premières semaines de croissance. Ceci étant car la superficie racinaire est augmentée par la présence d'hyphes et permet donc à la plante d'obtenir plus de nutriments. Par contre, ces plants de maïs croissaient dans des conditions optimales, étant irrigués et fertilisés régulièrement. Dans de telles conditions, la mycorhization n'était peut-être pas aussi essentielle quant à l'obtention des nutriments nécessaires à la croissance des plants (Johnson et al. 1997). Il est aussi possible que l'échange entre les deux symbiotes ne soit pas totalement équitable et que le champignon retire plus de la plante hôte que l'inverse. La colonisation mycorhizienne peut réduire la croissance en acquérant directement le carbone fixé par la plante hôte, en compétitionnant directement avec la plante hôte pour le phosphate présent dans la rhizosphère, ou encore, en induisant une réaction de défense chez la plante hôte (Koide 1993). Ceci expliquerait ainsi la biomasse totale plus élevée des plants non mycorhizés à la

cinquième semaine, comme c'est aussi le cas de la biomasse des plants de la septième semaine de la seconde expérience.

La hauteur des plants de la première expérience augmente avec le temps, mais la mycorhization et les différents cultivars ont des effets différents selon les semaines. On ne peut donc tirer aucune conclusion directe de cette variable. À la deuxième expérience, les plants non mycorhizés étaient plus hauts que les plants mycorhizés aux semaines 3 et 5, mais leur biomasse était semblable. Les plants témoins tendent à être plus élancés que les plants mycorhizés. Les effets bénéfiques de la mycorhization n'apparaissent pas toujours en terme de biomasse augmentée. Pozo et al. (1998) n'ont observé aucun effet significatif de la colonisation avec *Glomus mosseae*, ni avec *G. intraradices* quant à la croissance des plants de tomates lors des différentes récoltes effectuées (4, 6, 8, 10 et 12 semaines). Une autre étude faite sur le maïs colonisé par *G. mosseae* n'a révélé aucune différence significative entre la masse sèche des parties aériennes des plants mycorhizés versus celle des plants témoins (Kothari et al. 1990). Cependant, la surface foliaire des plants mycorhizés était nettement supérieure (39.5%). L'augmentation de la surface foliaire suite à la mycorhization est peut-être une modification de la plante hôte permettant d'augmenter sa capacité photosynthétique, et par conséquent le transfert de carbone au champignon mycorhizien, puisque la défoliation diminue l'étendue de la colonisation mycorhizienne (Gianinazzi-Pearson et Gianinazzi 1983). Il est donc possible que la mycorhization modifie la morphologie des plants en les maintenant plus courts, comme en témoigne la deuxième expérience, mais en augmentant la surface foliaire. Ce paramètre n'a toutefois pas été vérifié chez mes plants de maïs.

### 4.3 Concentration en protéines

La concentration en protéines chez le maïs tend à diminuer avec le temps, puisque la biomasse de la plante augmente. Plusieurs auteurs ont rapporté une concentration plus élevée en protéines des plants mycorhizés en comparaison aux témoins chez diverses espèces végétales tel que *Cichorium intybus* (Dalpé et al. 1994), *Trifolium pratense* (Arines et al. 1993), et le maïs (Charest et al. 1993, Subramanian et Charest 1995). Cette synthèse accrue des protéines chez les plants mycorhizés peut être attribuable à une plus grande quantité de nutriments disponibles et absorbés grâce aux hyphes qui augmentent leur superficie racinaire (George et al. 1992, 1995). En effet, des études faites par Johansen et al. (1993, 1994) révèlent que les hyphes externes de *G. intraradices* peuvent absorber l'azote minéral du milieu de croissance et le transférer à la plante hôte, *Cucumis sativus*. De plus, lorsque *Phaseolus vulgaris* est colonisé par différentes espèces de champignons mycorhiziens, sa concentration totale en phosphore est significativement augmentée, de même que sa capacité de fixer l'azote atmosphérique (Ibijbijen et al. 1996). À la première expérience, tant au niveau des feuilles que des racines, les mycorhizes ont un effet bénéfique sur la concentration en protéines à certaines semaines. Cet effet n'est donc pas tout à fait constant dans le temps. Par contre, lors de la seconde expérience, la quantité de protéines présente dans les racines est généralement supérieure chez les plants mycorhizés, donc plus constante, ce qui est en accord avec les études mentionnées ci-haut. On remarque qu'aux semaines où la concentration en protéines est plus élevée chez les plants mycorhizés, l'activité enzymatique de la PAL et de la peroxydase l'est aussi.

La concentration en protéines des deux cultivars, lors de la première expérience, est variable selon les semaines et le traitement mycorhizien. Généralement, un cultivar sélectionné génétiquement pour une plus grande concentration en protéines aurait démontré une plus grande concentration tout au long des semaines. Ne connaissant pas l'identité génétique de ces cultivars, je peux seulement déduire qu'aucun des deux ne se démarque à la hausse pour ce paramètre. La sélection génétique des cultivars est tellement rigoureuse quant aux paramètres permettant d'augmenter le rendement des cultures, qu'elle contre-sélectionne peut-être pour la présence d'effets bénéfiques des mycorhizes sur les métabolites primaires chez certains cultivars. Selon Hetrick et al. (1996), la dépendance mycorhizienne est contrôlée génétiquement par la plante hôte. Ces auteurs avaient étudié dix cultivars de blé colonisés par cinq champignons mycorhiziens différents, et quatre de ces cultivars ont réagi négativement ou n'ont montré aucune réaction à la colonisation mycorhizienne.

#### 4.4 Activité de la PAL

L'activité enzymatique de la PAL augmente dramatiquement chez la plante en réponse à une variété de stimuli comme les blessures, la lumière et l'éthylène (Lamb et al. 1979). La quantité de PAL présente dans une partie de la plante peut augmenter significativement suite à une blessure ou à l'infection par un agent pathogène (Camm et Towers 1973). Bolwell et al. (1986) ont observé une induction de l'activité de la PAL dans les cellules de *P. vulgaris* lorsque mises en contact avec une préparation cellulaire du champignon phytopathogène *Colltotrichum lindemuthianum*. Des études montrent la résistance

accrue des racines mycorhizées à des pathogènes tels que *Pythium ultimum* et *Fusarium oxysporum* (St-Arnaud et al. 1994, 1997 et Benhamou et al. 1994).

L'activité de la PAL des racines de maïs augmente de la deuxième à la cinquième semaine, pour ensuite diminuer. La présence de mycorhizes tend à accroître l'activité de la PAL à la cinquième semaine. Ceci vient appuyer les résultats obtenus par le groupe de Volpin (1994) qui avait observé une activité accrue de la PAL dans les racines de luzerne (*Medicago sativa* L.) colonisées par *G. intraradices* à 3 semaines de croissance. Ces auteurs avaient aussi observé une augmentation de la chalcone isomérase et de la chitinase, deux enzymes présentes dans le processus de défense des plantes, chez la luzerne mycorhizée. Selon Spanu et al. (1989) l'activité de la chitinase chez les plants d'*Allium porrum* est plus élevée chez les plants mycorhizés par *G. versiforme* entre 10 et 20 jours après l'inoculation, après quoi, l'activité devient plus basse que chez les plants témoins. Blee et Anderson (1996) ont mesuré une accumulation de l'ARN messenger pour la transcription de la PAL dans les cellules corticales des racines de *Phaseolus vulgaris* contenant des arbuscules de *G. intraradices*. Un seul temps a été pris en considération dans cette étude, 28 jours, ce qui coïncide avec nos observations. Par contre, il aurait été intéressant de voir si cette accumulation dans les cellules corticales variait avec le temps, pour pouvoir déterminer si cette augmentation était présente seulement au début ou tout au long de la croissance de plants.

Par contre, l'activité de la PAL n'a pas été influencée par la colonisation des racines d'*Allium porrum* et *Ginkgo biloba* avec *G. versiforme* (Codignola et al. 1989) et de *Phaseolus vulgaris* par *G. mosseae* (Mohr et al. 1998), bien que cette dernière étude ait comporté plusieurs observations à des temps de croissance



différents. Codignola et al. (1989) ont fait leurs observations sur des plantes âgées de 3 mois. Ainsi, selon l'hypothèse stipulant que cette réaction de "pseudo-défense" se produit dès les premières étapes de la colonisation mycorhizienne, il est très plausible qu'ils n'aient détecté aucun changement, leurs plantes étant trop âgées. Il semble que le type de champignon endomycorhizien et l'espèce de la plante hôte influence la nature de l'interaction, c'est-à-dire la présence ou l'absence de réaction du système de défense chez la plante hôte.

L'observation d'un brusque renversement de l'activité de la PAL chez les plants de la septième semaine à la première expérience (activité des plants témoins > activité des plants mycorhizés) n'a cependant pas été corroborée dans la deuxième expérience en serre. Ces résultats ne sont donc pas tout à fait concluants.

#### **4.5 Activité de la peroxydase**

Comme pour la PAL, on observe une activité de la peroxydase croissante de la troisième à la cinquième semaine, et une diminution à la septième semaine. De plus, l'activité de la peroxydase chez les plants mycorhizés est supérieure à celle des plants témoins. Par contre, cette activité accrue chez les plants mycorhizés est présente à toutes les semaines, et non pas seulement lors du pic de l'activité enzymatique comme c'est le cas pour la PAL. Spanu et Bonfante-Fasolo (1988) ont étudié l'activité de la peroxydase chez *Allium porrum* mycorhizé ou non par *Glomus versiforme*. Leurs résultats sont comparables à ceux obtenus dans la présente étude: l'activité chez leurs plants mycorhizés était supérieure à celle des plants témoins. Cependant, leur point culminant de

**l'activité de la peroxydase était plus hâtif (16 jours) chez les plants mycorhizés que chez les témoins. Pour McArthur et Knowles (1992) le point culminant de l'activité de la peroxydase se situait environ à 28 jours de croissance et était le même chez les racines de pomme de terre témoins que chez les racines mycorhizées, bien que l'activité soit supérieure chez ces dernières. Les résultats de la première expérience montrent clairement que l'activité de la peroxydase est supérieure chez les plants mycorhizés. Dans une autre étude, les ectomycorhizes n'ont pas influencé l'activité de la peroxydase, ni celle de la PAL, dans les racines de *Pinus sylvestris* (Ronald et Söderhäll 1985).**

**L'activité de la peroxydase augmente lorsque la plante est infectée par un organisme pathogène. Par contre, elle n'est pas active dans les cellules contenant des arbuscules (Gianinazzi-Pearson et al. 1996), tout comme la PAL. Ce qui laisse croire que la réaction de défense de la plante s'effectue au moment et à l'endroit où les hyphes pénètrent le cortex de la racine et non pas lorsque les arbuscules sont formées à l'intérieur des cellules afin de permettre l'échange de nutriments (Gianinazzi-Pearson et al. 1996).**

**Les résultats obtenus en ce qui concerne l'activité de la peroxydase et de la PAL permettent de postuler que les plants possédant des mycorhizes à vésicules et à arbuscules seraient plus résistants aux attaques de micro-organismes pathogènes que les plants témoins, puisque certaines enzymes du processus de défense sont déjà actives dans leurs racines, du moins lors des premières étapes de la colonisation mycorhizienne.**

#### 4.6 Phénols solubles

D'après les résultats obtenus lors de la première expérience, la mycorhization n'a pas eu d'effet sur la concentration en phénols solubles des feuilles. Cependant, le cultivar PRI avait une quantité de phénols supérieure durant les premières semaines de croissance. Il est possible que ce cultivar ait eu une concentration en phénols plus grande dès le départ. La quantité de phénols solubles des racines du cultivar PIO augmentait avec la mycorhization à une certaine semaine.

La mycorhization n'a pas eu un effet constant sur la quantité de phénols solubles présente chez les plants de la deuxième expérience. En effet, les résultats varient selon les semaines. Par contre, la concentration est augmentée chez les plants mycorhizés à la cinquième semaine, ce qui coïncide avec la semaine où les activités enzymatiques de la PAL et de la peroxydase étaient les plus élevées chez les plants mycorhizés. Chez *Allium porrum* et *Ginkgo biloba*, la quantité totale de phénols ne variait pas entre les plants mycorhizés ou non (Codignola et al. 1989).

Nagahashi et al. (1996) ont montré que des plantes de *Daucus carota* hôtes des champignons endomycorhiziens possèdent différents phénols associés à la paroi cellulaire (acide p-hydroxybenzoïque et acide vanillique) que n'ont pas les plantes de *Beta vulgaris* non-hôtes des mycorhizes. Les racines de plants de tomates mycorhizés font la synthèse de molécules de défense uniques à la symbiose (isoformes acides des chitinases) et non-produites en réaction à un pathogène, *Phytophthora parasitica* (Pozo et al. 1998). Plusieurs espèces de plantes en symbiose mycorhizienne accumulent davantage et synthétisent d'autres

composés issus du métabolisme des phénylpropanoïdes que leurs homologues non mycorhizés (Gianinazzi-Pearson et al. 1996, Kapulnik et al. 1996, Morandi 1996, Volpin et al. 1994), comme des isoflavonoïdes et des flavonoïdes. Il a été montré que plusieurs de ces substances stimulent la colonisation mycorhizienne et la croissance des hyphes (Phillips et Tsai 1992, Siqueira et al. 1991). Seule la présence du champignon endomycorhizien dans la rhizosphère induit chez certaines plantes la production de composés de défense (Kapulnik et al. 1996).

#### **4.7 Acides hydroxamiques**

Les acides hydroxamiques sont naturellement présents chez les Poacées, tel que le maïs, et sont actifs quant à la défense des plantes contre les insectes et les champignons (Xie et al. 1991). Plus particulièrement, le DIMBOA et le MBOA, un de ses sous-produits, sont actifs contre plusieurs agents pathogènes présents chez le maïs, tels que *Ostrinia nubilalis* et *Erwinia* sp. (Klun et Robinson 1969, Corcuera et al. 1978) et chez le blé, tel que *Schizaphis graminum* (Argandoña et al. 1981). D'après nos résultats, les concentrations en DIMBOA et MBOA ne sont pas influencées par la présence des endomycorhizes. La concentration des acides hydroxamiques demeure relativement faible et constante dans le temps, sans être affectée par la présence de mycorhizes. Les conditions d'expérimentation avaient pourtant été optimisées, en utilisant les racines de maïs à différents stades au début de leur croissance. En effet, les racines de maïs sont la partie de la plante ayant une plus grande concentration de 1,4-benzoxazinones et ces composés sont présents surtout au début de la croissance de la plante (Xie et al. 1991).

Selon Peipp et al. (1997), l'accumulation d'amides d'acides hydroxycinnamiques dans les racines d'orge mycorhizées par *Glomus intraradices* reflète une réaction de défense passagère à la colonisation par le champignon endomycorhizien. L'étude de Maier et al. (1995) révèle la présence d'un terpénoïde glycoside, le blumenin, présent seulement dans les racines des plants mycorhizés chez le blé, l'orge, l'avoine et le seigle. Par contre, ce composé nouvellement identifié ne serait pas présent chez le maïs (Maier et al. 1995), ce qui n'exclut pas la possibilité que d'autres composés soient uniques au maïs. La détermination de la concentration de certains acides hydroxamiques, le DIMBOA et le MBOA, chez des plantes en symbiose mycorhizienne est cependant une nouveauté.

#### 4.8 Conclusion

La présence du champignon endomycorhizien, *Glomus intraradices*, ne semble pas affecter la biomasse des plants de maïs. La concentration en protéines et en phénols solubles tend par contre à augmenter aux temps où l'activité enzymatique de la PAL et de la peroxydase est plus élevée, chez les plants mycorhizés, lors de la première expérience. La présence de mycorhizes tend à accroître l'activité de la PAL à la cinquième semaine. L'activité de la PAL et de la peroxydase des racines de maïs augmente de la deuxième à la cinquième semaine, pour ensuite diminuer. De plus, l'activité de la peroxydase chez les plants mycorhizés est supérieure à celle des plants témoins. Cette activité accrue de la peroxydase chez les plants mycorhizés est présente à toutes les semaines. La présence du champignon mycorhizien tend à provoquer une réaction de défense aux premiers stades de colonisation et de croissance, chez le maïs. Bien

que la présence du champignon mycorhizien tend à initier diverses réactions de défense chez la plante hôte, ces réactions ne sont toutefois pas assez prononcées pour empêcher la colonisation, comme l'ont observées Kapulnik et al. (1996).

La concentration des acides hydroxamiques étudiés, le DIMBOA et le MBOA, est la même chez les plants mycorhizés et non-mycorhizés. La faible colonisation mycorhizienne du maïs n'a peut-être pas permis l'observation de différences significatives entre les plants mycorhizés et témoins lors de cette expérience.

## RÉFÉRENCES

- Argandoña V.H. Niemeyer H.M. et Corcuera L.J. 1981. Effect of content and distribution of hydroxamic acids in wheat on infestation by the aphid *Schizaphis graminum*. *Phytochem.* 20: 673-676.
- Arines J. Palma J.M. et Vilarino A. 1993. Comparison of protein patterns in non-mycorrhizal and vesicular-arbuscular mycorrhizal roots of red clover. *New Phytol.* 123: 763-768.
- Atkinson J.R. 1989. A structure-activity study of naturally occurring and synthetic hydroxamic acids. Thèse de Doctorat. Université d'Ottawa, Ottawa.
- Benhamou N. Fortin J.A. Hamel C. St-Arnaud M. et Shatilla A. 1994. Resistance response of mycorrhizal Ri T-DNA-transformed carrot roots to infection by *Fusarium oxysporum* f. sp. *chrysanthemi*. *Phytopathol.* 84: 958-968.
- Bennett R. et Wallsgrove R.M. 1994. Tansley Review No. 72, Secondary metabolites in plant defence mechanisms. *New Phytol.* 127: 617-633.
- Bergvinson D. 1993. Role of phenolic acids in maize resistance to the European corn borer, *Ostrinia nubilalis* (Hübner). Thèse de doctorat, Université d'Ottawa, Ottawa.
- Bhattacharyya M.K. et Ward E.W.B. 1988. Phenylalanine ammonia-lyase activity in soybean hypocotyl and leaves following infection with *Phytophthora megasperma* f. sp. *glycinea*. *Can. J. Bot.* 66: 18-23.

- Birecka H. Catalfamo J.L. et Garraway M.O. 1975. Cell wall and protoplast isoperoxidases of corn leaves in relation to cut injury and infection with *Helminthosporium maydis* . Plant Physiol. 55: 607-610.
- Blee K.A. et Anderson A.J. 1996. Defense-related transcript accumulation in *Phaseolus vulgaris* L. colonized by the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* Schenck & Smith. Plant Physiol. 110: 675-688.
- Bockholt A.J. 1979. Biology and Breeding of Corn. Dans: Harris M.K. Biology and Breeding for Resistance to Arthropods and Pathogens in Agricultural Plants. Texas A&M University College Station, Texas.
- Bolwell G.P. Cramer C.L. Lamb C.J. Schuch W. et Dixon R.A. 1986. L-phenylalanine ammonia-lyase from *Phaseolus vulgaris* : Modulation of the levels of active enzyme by *trans*-cinnamic acid. Planta 169: 97-107.
- Boucher A. Dalpé Y. et Charest C. 1999. Effects of arbuscular mycorrhizal colonisation of four species of *Glomus* on physiological responses of maize. J. Plant Nutrit. vol.22: 783-797.
- Bradford M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of proteins utilizing the principle of protein dye-binding. Ann. Biochem. 72: 248-254.



- Bray H. G. et Thorpe W. V. 1954. Analysis of phenolic compounds of interest in metabolism. Dans: Glick D. (éd.) *Methods of biochemical analysis* 1: 27-52. Interscience Publishers, Inc. New York.
- Brundrett M. Bougher N. Dell B. Grove T. Malajczuk N. 1996. *Working with mycorrhizas in forestry and agriculture*. Australian Center for International Agricultural Research, Australia.
- Camm E.L. et Towers G.H.N. 1973. Review Article: Phenylalanine Ammonia Lyase. *Phytochem.* 12: 961-973.
- Charest C. Dalpé Y. et Brown A. 1993. The effect of vesicular-arbuscular mycorrhizae and chilling on two hybrids of *Zea mays* L. *Mycorrhiza* 4: 89-92.
- Codignola A. Verotta L. Spanu P. Maffei M. Scannerini S. et Bonfante-Fasolo P. 1989. Cell wall bound-phenols in roots of vesicular-arbuscular mycorrhizal plants. *New Phytol.* 112: 221-228.
- Collins F.W. 1986. Oat phenolics: Structure, occurrence, and function. Dans: Webster F.H. éd. *Oats: Chemistry and technology*. American Association of Cereal Chemists, Inc. St-Paul, Minnesota.
- Corcuera L.J. Woodward M.D. Helgeson J.P. Kelman A. et Upper C.D. 1978. 2,4-dihydroxy-7-methoxy-2H-1,4-benzoxazin-3(4H)-one, an inhibitor from *Zea mays* with differential activity against soft rotting *Erwinia* species. *Plant Physiol.* 61: 791-795.

- Dalpe Y. 1995. *Systématique des endomycorhizes à arbuscules: de la mycopaléontologie à la biochimie*. Dans: Fortin J.A. Charest C et Piché Y. *La symbiose mycorhizienne. État des connaissances*. Éditions Orbis, Québec.
- Dalpe Y. Charest C. et Mitrow G. 1994. *Mycorrhizal dependency of radicchio (*Cichorium intybus* L.) and the growth impact of effective mycorrhizal partnership*. Dans: Azcon-Aguilar C. et Barea J.M. (éd.) *Mycorrhizas in integrated systems from genes to plant development*. European Commission, Bruxelles.
- Dalpe Y. 1993. *Vesicular-arbuscular mycorrhizae*. Dans: Carter M.R. (éd.) *Soil sampling and methods of analysis*, 3e éd. Canadian Society of Soil Science, CRC Press, pp 287-301.
- Dixon R.A. et Paiva N.L. 1995. *Stress-Induced phenylpropanoid metabolism*. *Plant Cell* 7: 1085-1097.
- Flocker W.J. et Kofranek A.M. 1981. *Growth Development and Utilisation of Cultivated Plants*. Prentice-Hall Inc. Englewood, New Jersey.
- Francis A. 1990. *The Tripsacinae: An interdisciplinary review of maize (*Zea mays*) and its relatives*. *Acta Bot. Fennica* 140: 1-51.
- Frank A.B. 1885. *Über die auf Wurzelsymbiose beruhende Ernährung gewisser Bäume durch unterirdische Pilze*. *Ber. Deut. Bot. Gesell.* 3: 128-145. Dans: Sieverding E. 1991. *Vesicular-Arbuscular Mycorrhiza Management in*

Tropical Agrosystems. Technical Cooperation, Federal Republic of Germany, Eschborn.

Galinat W. C. 1992. Evolution of corn. *Adv. Agron.* 47: 203-231.

George E. Marschner H. et Jakobsen I. 1995. Role of arbuscular mycorrhizal fungi in uptake of phosphorus and nitrogen from soil. *Crit. Rev. Biotechnol.* 15: 257-270.

George E. Häussler K.U. Vetterlein D. Gorgus E. et Marschner H. 1992. Water and nutrient translocation by hyphae of *Glomus mosseae*. *Can. J. Bot.* 70: 2130-2137.

Gianinazzi-Pearson V. Dumas-Gaudot E. Gollotte A. Tahiri-Alaoui A. et Gianinazzi S. 1996. Cellular and molecular defence-related root responses to invasion by arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytol.* 133: 45-57.

Gianinazzi-Pearson V. et Gianinazzi S. 1983. The physiology of vesicular-arbuscular mycorrhizal roots. *Plant and Soil* 71: 197-209.

Giovannetti M. Sbrana C. et Logi C. 1994. Early processes involved in host recognition by arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytol.* 127: 703-709.

Guignard J.L. 1996. *Biochimie végétale. Chapitre 9: Composés aromatiques.* Éditions Masson, Paris.

- Gutierrez C. Guerrero A. Castanera P. et Torres J.V. 1982. A high-performance liquid chromatographic method for quantitation of DIMBOA and MBOA in maize plant extract. *J. Agric. Food Chem.* 30: 1258-1260.
- Hanson K.R. et Havir E.A. 1981. Phenylalanine Ammonia-Lyase. Dans: Stumpf P.K. et Conn E.E. éd. *The Biochemistry of Plants A Comprehensive Treatise. Volume 7: Secondary Plant Products.* Academic Press, New York.
- Harborne J.B. 1980. Plant phenolics. Dans: Bell E.A. et Charlwood B.V. éd. "Encyclopedia of plant physiology", New series. Volume 8: Secondary plant products. Springer-Verlag, New York.
- Harley J.L. 1994. Introduction: The State of the Art. Dans: Norris J.R. Read D.J. et Varma A.K. (éd.) *Techniques for Mycorrhizal Research.* Academic Press, San Diego.
- Havir E.A. Reid P.D. et Marsh H.V. 1971. L-Phenylalanine Ammonia-Lyase (Maize): Evidence for a Common Catalytic Site for L-Phenylalanine and L-Tyrosine. *Plant Physiol.* 48: 130-136.
- Hetrick B.A.D. Wilson G.W.T. et Todd T.C. 1996. Mycorrhizal response in wheat cultivars: relationship to phosphorus. *Can. J. Bot.* 74: 19-25.
- Hoagland D.R. et Arnon D.I. 1950. The water culture method of growing plants without soil. *California Agriculture Experiment Station Circular* 347.

- Ibijbijen J. Ruquiaga S. Ismaili M. Alves B.J.R. et Boddey R.M. 1996. Effect of mycorrhizal fungi on growth, mineral nutrition and nitrogen fixation of three varieties of common beans (*Phaseolus vulgaris*). *New Phytol.* 134: 353-360.
- Johansen A. Jakobsen I. et Jensen E.S. 1994. Hyphal N transport by a vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus associated with cucumber grown at three nitrogen levels. *Plant and Soil* 160: 1-9.
- Johansen A. Jakobsen I. et Jensen E.S. 1993. Hyphal transport by a vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus of N applied to the soil as ammonium or nitrate. *Biol. Fertil. Soils* 16: 66-70.
- Johnson N.C. Graham J.H. et Smith F.A. 1997. Functioning of the mycorrhizal associations along the mutualism-parasitism continuum. *New Phytol.* 135: 575-585.
- Kapulnik Y. Volpin H. Itzhaki H. Ganon D. Galil S. David R. Shaul O. Elad Y. Chet I. et Okon Y. 1996. Suppression of defence responses in mycorrhizal alfalfa and tobacco roots. *New Phytol.* 133: 59-64.
- Khalil S. Loynachan T.E. et Tabatabai M.A. 1994. Mycorrhizal dependency and nutrient uptake by improved and unimproved corn and soybean cultivars. *Agron. J.* 86: 949-958.
- Klun J.A. et Robinson J.F. 1969. Concentration of two 1,4-benzoxazinones in dent corn at various stages of development of the plant and its relation to

- resistance of the host plant to the European Corn Borer. *J. Econ. Entomol.* 62: 214-220.
- Koide R.T. 1993. Physiology of the mycorrhizal plant. *Adv. Plant Pathol.* 9: 33-51.
- Kothari S.K. Marschner H. et George E. 1990. Effect of mycorrhizal fungi and rhizosphere microorganisms on root and shoot morphology, growth and water relations in maize. *New Phytol.* 116: 303-311.
- Koukol J. et Conn E.E. 1961. The metabolism of aromatic compounds in higher plants. IV. Purification and properties of the phenylalanine deaminase of *Hordeum vulgare*. *J. Biol. Chem.* 236: 2692-2698.
- Lamb C.J. Merritt T.K. et Butt V.S. 1979. Synthesis and removal of phenylalanine ammonia-lyase activity in illuminated discs of potato tuber parenchyme. *Bioch. Biophys. Acta* 582: 196-212.
- MacIsaac S. M. 1997. Role of extracellular peroxidase in maize, *Zea mays* (L.) resistance to the european corn borer, *Ostrinia nubilalis* (Hübner). Thèse de maîtrise, Université d'Ottawa, Ottawa.
- Maier W. Peipp H. Schmidt J. Wray V. et Strack D. 1995. Levels of a tepenoid glycoside (blumenin) and cell wall-bound phenolics in some cereal mycorrhizas. *Plant Physiol.* 109: 465-470.

- McArthur D.A.J. et Knowles N.R. 1992. Resistance responses of potato vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi under varying abiotic phosphorus levels. *Plant Physiol.* 100: 341-351.
- Mohr U. Lange J. Boller T. Wiemken A. et Vögeli-Lange R. 1998. Plant defence genes are induced in the pathogenic interaction between bean roots and *Fusarium solani* , but not in the symbiotic interaction with the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae*. *New Phytol.* 138: 589-598.
- Morandi D. 1996. Occurrence of phytoalexins and phenolic compounds in endomycorrhizal interactions, and their potential role in biological control. *Plant and Soil* 185: 241-251.
- Munson J.W. 1982. Chemistry and biologic activity of hydroxamic acids - An overview. Dans: Kehl H. (éd.) *Chemistry and biology of hydroxamic acids*. Karger, New York, pp. 1-13.
- Nagahashi G. Abney G.D. et Doner L.W. 1996. A comparative study of phenolic acids associated with cell walls and cytoplasmic extracts of host and non-host roots for AM fungi. *New Phytol.* 133: 281-288.
- Niemeyer H.M. 1988. Hydroxamic acids (4-hydroxy-1,4-benzoxazin-3-ones), defence chemicals in the Gramineae. *Phytochem.* 27: 3349-3358.
- Niemeyer H.M. Bravo H.R. Peña G.F. et Corcuera L.J. 1982. Decomposition of 2,4-dihydroxy-7-methoxy-2H-1,4-benzoxazin-3-(4H)-one, a hydroxamic

acid from Gramineae. Dans: Kehl H. (éd.) Chemistry and biology of hydroxamic acids. Karger, New York, pp. 22-28.

Peipp H. Maier W. Schmidt J. Wray V. et Strack D. 1997. Arbuscular mycorrhizal fungus-induced changes in the accumulation of secondary compounds in barley roots. *Phytochem.* 44: 581-587.

Phillips D.A. et Tsai S.M. 1992. Flavonoids as plant signals to rhizosphere microbes. *Mycorrhiza* 1: 55-58.

Plenchette C. Fortin J.A. et Furlan V. 1983. Growth responses of several plant species to mycorrhizae in a soil of moderate P-fertility. *Plant and Soil* 70: 199-209.

Pozo M.J. Azcón-Aguilar C. Dumas-Gaudot E. et Barea J.M. 1998. Chitosanase and chitinase activities in tomato roots during interactions with arbuscular mycorrhizal fungi or *Phytophthora parasitica* . *J. Exp. Bot.* 49: 1729-1739.

Ronald P. et Söderhäll K. 1985. Phenylalanine ammonia-lyase and peroxidase activity in mycorrhizal and nonmycorrhizal short roots of scots pine, *Pinus sylvestris* L. *New Phytol.* 101: 487-494.

Salisbury F.B. et Ross C.W. 1992. *Plant Physiology, Fourth Edition.* Wadsworth Publishing Company, California.



- Selosse M.A. et Le Tacon F. 1998. The land flora: a phototroph-fungus partnership? *Trends in Ecology and Evolution* 13: 15-20.
- Simon L. Bousquet J. Levesque R.C. et Lalonde M. 1993. Origin and diversification of endomycorrhizal fungi and coincidence with vascular land plants. *Nature* 363: 67-69.
- Siqueira J.O. Safir G.R. et Nair M.G. 1991. Stimulation of vesicular-arbuscular mycorrhiza formation and growth of white clover by flavonoid compounds. *New Phytol.* 118: 87-93.
- Smith S.E. et Gianinazzi-Pearson V. 1988. Physiological interactions between symbionts in vesicular-arbuscular mycorrhizal plants. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 39: 221-244.
- Smith S.E. et Read D.J. 1997. *Mycorrhizal Symbiosis*, 2<sup>e</sup> édition. Academic Press, San Diego.
- Sokal R.R. et Rohlf F.J. 1995. *Biomerty, The principles and practice of statistics in biological research*. Troisième édition. W.H. Freeman and Company, New York.
- Spanu P. Boller T. Ludwig A. Wiemken A. Faccio A. et Bonfante-Fasolo P. 1989. Chitinase in roots of mycorrhizal *Allium porrum* : regulation and localisation. *Planta* 177: 447-455.

- Spanu P. et Bonfante-Fasolo P. 1988. Cell-wall-bound peroxidase activity in roots of mycorrhizal *Allium porrum*. *New Phytol.* 109: 119-124.
- St-Arnaud M. Hamel C. Vimard B. Caron M. et Fortin J.A. 1997. Inhibition of *Fusarium oxysporum* f.sp. *dianthi* in the non-VAM species *Dianthus caryophyllus* by co-culture with *Tagetes patula* companion plants colonized by *Glomus intraradices*. *Can. J. Bot.* 75: 998-1005.
- St-Arnaud M. Hamel C. Caron M. et Fortin J.A. 1994. Inhibition of *Pythium ultimum* in roots and growth substrate of mycorrhizal *Tagetes patula* colonized with *Glomus intraradices*. *Can. J. Plant Pathol.* 16: 187-194.
- Subramanian K. S. et Charest C. 1998. Arbuscular mycorrhizae and nitrogen assimilation in maize after drought and recovery. *Physiol. Plant.* 102: 285-296.
- Subramanian K. S. Charest C. Dwyer L. M. et Hamilton R. I. 1997. Effects of arbuscular mycorrhizae on leaf water potential, sugar content, and P content during drought and recovery of maize. *Can. J. Bot.* 75: 1582-1591,
- Subramanian K.S. et Charest C. 1997. Nutritional, growth, and reproductive responses of maize (*Zea mays* L.) to arbuscular mycorrhizal inoculation during and after drought stress at tasselling. *Mycorrhiza* 7: 25-32.
- Subramanian K. S. et Charest C. 1995. Influence of arbuscular mycorrhizae on the metabolism of maize under drought stress. *Mycorrhiza* 5: 273-278.

Subramanian K.S. Charest C. Dwyer L.M. et Hamilton R.I. 1995. Arbuscular mycorrhizas and water relations in maize under drought stress at tasseling. *New Phytol.* 129: 643-650.

Volpin H. Elkind Y. Okon Y. et Kapulnik Y. 1994. A vesicular arbuscular mycorrhizal fungus (*Glomus intraradix*) induces a defense response in alfalfa roots. *Plant Physiol.* 104: 683-689.

Walker J.L.R. 1975. The biology of plant phenolics. The institute of biology's studies in biology no. 54. Edward Arnold Limited, London.

Xie Y.S. Atkinson J. Arnason J.T. Morand P. and Philogène B.J.R. 1991. Separation and quantification of 1,4-benzoxazin-3-ones and benzoxazolin-2-ones in maize root extract by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr.* 543: 389-395.

Xie Y.S. Arnason J.T. Philogène B.J.R. Atkinson J. et Morand P. 1991. Distribution and variation of hydroxamic acids and related compounds in maize (*Zea mays*) root system. *Can. J. Bot.* 69: 677-681.

## **ANNEXE A**

### **Solution d'Hoagland**

**Solution d'Hoagland (Hoagland et Arnon 1950)**

<b>Sel</b>	<b>mM</b>	<b>mg/L (ppm)</b>
KNO <sub>3</sub>	6.0	235 K 196 N sous forme de NO <sub>3</sub>
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	4.0	14 N sous forme de NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> 160 Ca
NH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1.0	31 P
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	2.0	49 Mg 64 S
Fe-chelate		5 g/L
MnCl <sub>4</sub> ·4H <sub>2</sub> O	0.009	0.5 Mn; 6.5 Cl
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0.046	0.5 B
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.0008	0.05 Zn
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0.0003	0.02 Cu
H <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	0.0001	0.01 Mo

## **ANNEXE B**

**Courbe étalon pour la détermination des protéines**

**Courbe étalon pour la détermination des phénols solubles**

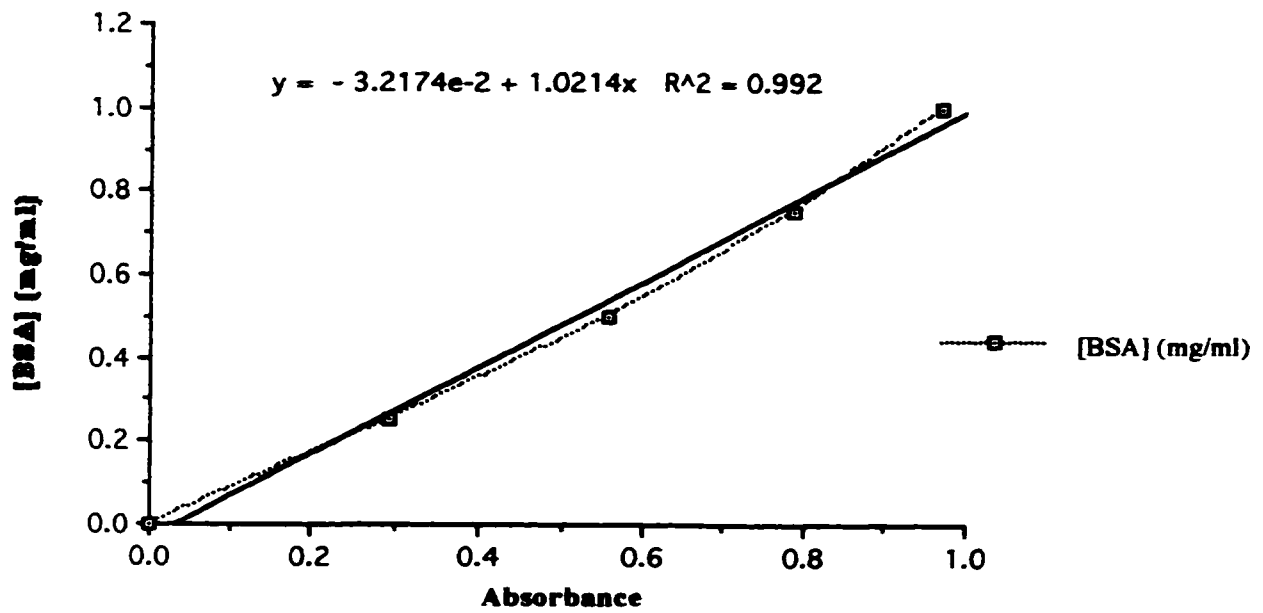


Figure B.1 Courbe étalon à base de sérum d'albumine bovine (BSA) servant à déterminer la concentration en protéines (mg/ml). L'absorbance est lue à 595 nm.

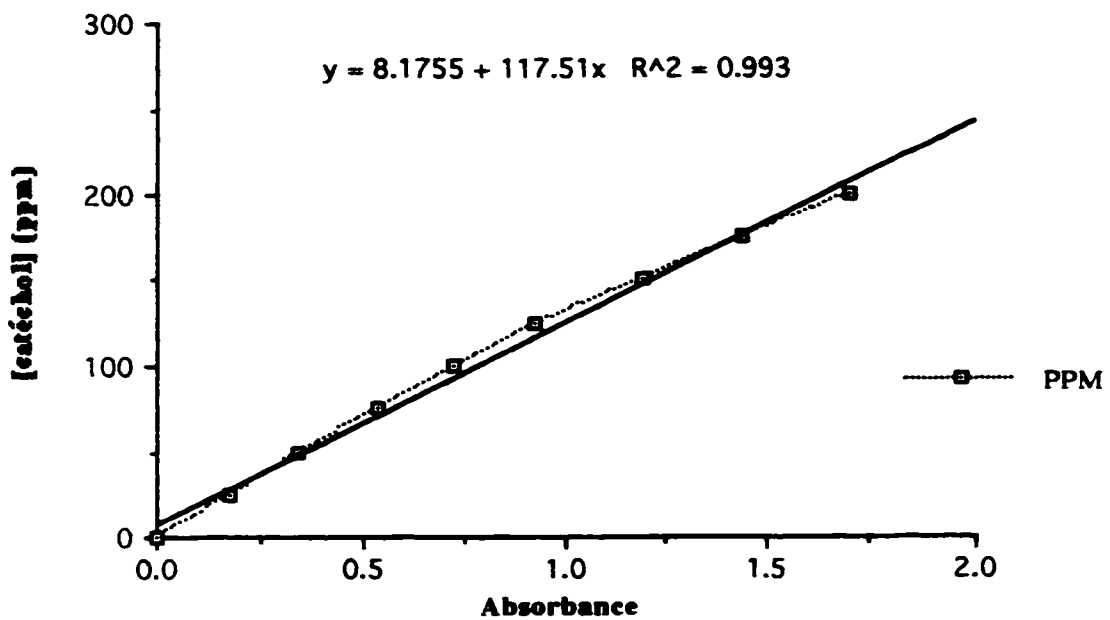


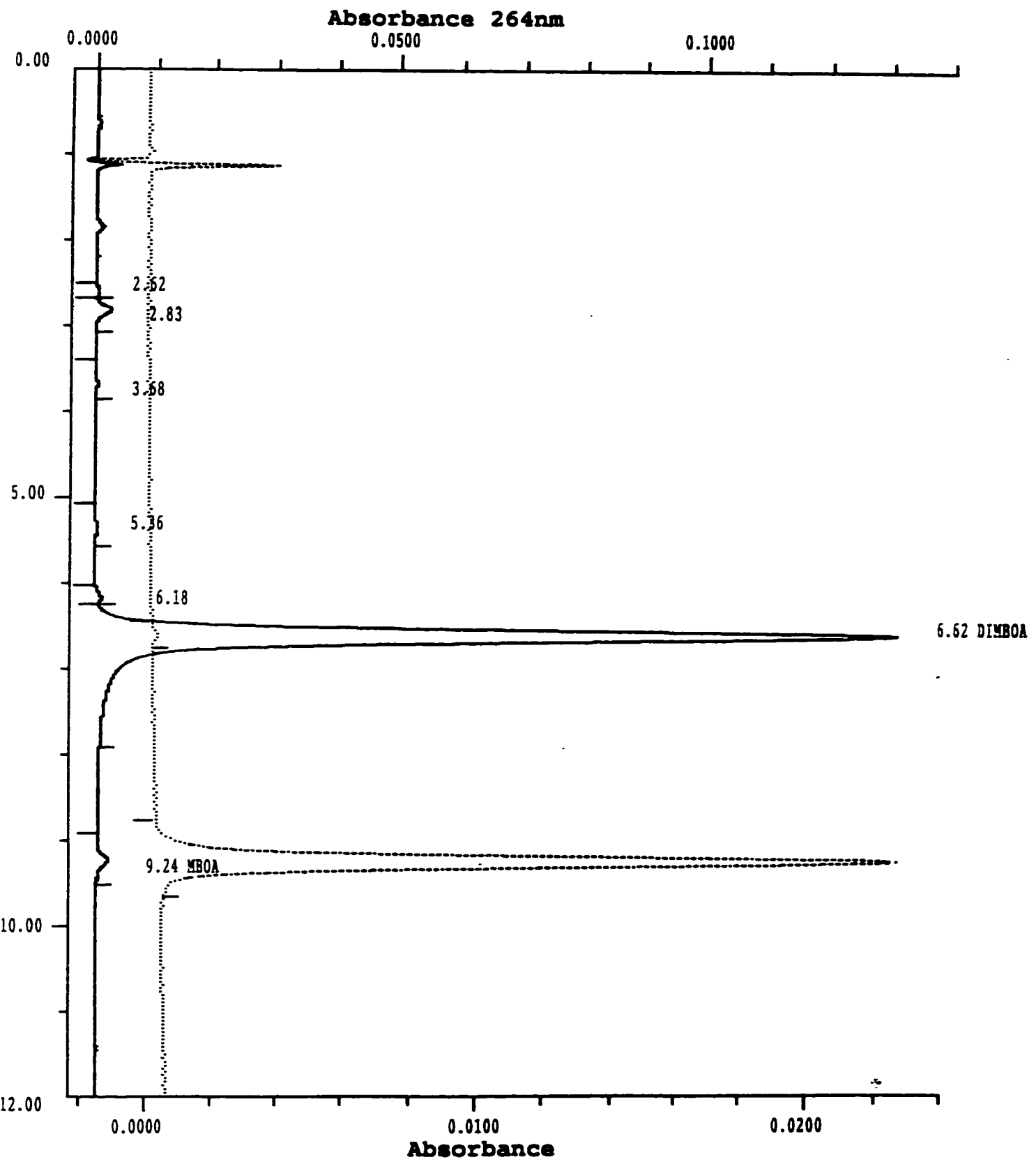
Figure B.2 Courbe étalon à base de catéchol servant à déterminer la concentration en phénols solubles (ppm). L'absorbance est lue à 800 nm.



## ANNEXE C

**Spectre d'absorbance du DIMBOA et du MBOA à 264 nm en fonction du temps de rétention des deux composés.**

ATA 1    DATA 2    .....



## **ANNEXE D**

### **Tableaux des tests t de Student et Tukey-Kramer suite aux ANOVAs**

**Figure D.1 Tests de t Student suite à l'interaction significative entre les semaines et le traitement mycorhizien de l'ANOVA de la biomasse sèche des parties aériennes des plants de la première expérience (Tableau 2). D'après l'ajustement de Bonferroni pour les 7 différentes semaines  $\alpha = 0.05/7 = 0.007$ . Une probabilité  $< 0.007$  indique que le traitement mycorhizien a un effet significatif.**

<b>Semaines</b>	<b>dl</b>	<b>F</b>	<b>p</b>
2	1	3.12	0.0877
3	1	0.9954	0.3354
4	1	0.9093	0.3565
5	1	9.4913	0.0081
6	1	0.06	0.8155
7	1	0.97	0.3405
10	1	4.91	0.0437

dl = degrés de liberté, F = distribution de Fischer, p = probabilité

**Figure D.2** Tests de t Student suite à l'interaction significative entre les semaines et le cultivar de l'ANOVA de la biomasse sèche des racines des plants de la première expérience (Tableau 2). D'après l'ajustement de Bonferroni pour les 7 différentes semaines  $\alpha = 0.05/7 = 0.007$ . Une probabilité  $< 0.007$  indique que le cultivar a un effet significatif.

<b>Semaines</b>	<b>dl</b>	<b>F</b>	<b>P</b>
2	1	73.6558	0.0000
3	1	28.52	0.0001
4	1	2.29	0.1525
5	1	0.38	0.5501
6	1	4.15	0.0626
7	1	3.31	0.0903
10	1	5.88	0.0321

dl = degrés de liberté, F = distribution de Fischer, p = probabilité

**Figure D.3 Tests de t Student suite aux interactions significatives entre les semaines et le traitement mycorhizien et les semaines et le cultivar de l'ANOVA de la biomasse sèche totale des plants de la première expérience (Tableau 2). D'après l'ajustement de Bonferroni pour les 7 différentes semaines  $\alpha = 0.05/14 = 0.00357$ . Une probabilité  $< 0.00357$  indique que le traitement mycorhizien ou le cultivar a un effet significatif.**

Semaines	dl	Mycorhizes		Cultivar	
		F	p	F	p
2	1	1.87	0.1822	91.45	0.0000
3	1	1.06	0.3212	59.98	0.0000
4	1	0.39	0.5405	6.59	0.0223
5	1	12.24	0.0035	2.68	0.1238
6	1	0.03	0.8661	4.52	0.0532
7	1	0.8301	0.3777	2.34	0.1480
10	1	4.69	0.0479	2.21	0.1589

dl = degrés de liberté, F = distribution de Fischer, p = probabilité

**Figure D.4** Tests de t Student suite à l'interaction significative entre les semaines et le traitement mycorhizien de l'ANOVA de la biomasse sèche des parties aériennes des plants de la seconde expérience (Tableau 3). D'après l'ajustement de Bonferroni pour les 3 différentes semaines  $\alpha = 0.05/3 = 0.017$ . Une probabilité  $< 0.017$  indique que le traitement mycorhizien a un effet significatif.

Semaines	dl	F	P
3	1	0.93	0.3475
5	1	2.91	0.1064
7	1	7.63	0.0128

dl = degrés de liberté, F = distribution de Fischer, p = probabilité

**Figure D.5** Tests de t Student suite à l'interaction significative entre les semaines et le traitement mycorhizien de l'ANOVA de la biomasse sèche des racines des plants de la seconde expérience (Tableau 3). D'après l'ajustement de Bonferroni pour les 3 différentes semaines  $\alpha = 0.05/3 = 0.017$ . Une probabilité  $< 0.017$  indique que le traitement mycorhizien a un effet significatif.

Semaines	dl	F	P
3	1	0.05	0.8330
5	1	0.27	0.6068
7	1	4.51	0.0477

dl = degrés de liberté, F = distribution de Fischer, p = probabilité

**Figure D.6** Tests de t Student suite à l'interaction significative entre les semaines et le traitement mycorhizien de l'ANOVA de la biomasse sèche totale des plants de la seconde expérience (Tableau 3). D'après l'ajustement de Bonferroni pour les 3 différentes semaines  $\alpha = 0.05/3 = 0.017$ . Une probabilité  $< 0.017$  indique que le traitement mycorhizien a un effet significatif.

Semaines	dl	F	P
3	1	0.24	0.6322
5	1	1.12	0.3056
7	1	7.61	0.0129

dl = degrés de liberté, F = distribution de Fischer, p = probabilité

**Figure D.7** Tests de t Student suite à l'interaction significative entre les semaines et le traitement mycorhizien de l'ANOVA sur la hauteur des plants de la seconde expérience (Tableau 5). D'après l'ajustement de Bonferroni pour les 3 différentes semaines  $\alpha = 0.05/3 = 0.017$ . Une probabilité  $< 0.017$  indique que le traitement mycorhizien a un effet significatif.

Semaines	dl	F	P
3	1	7.75	0.0122
5	1	29.58	0.0000
7	1	0.15	0.7049

dl = degrés de liberté, F = distribution de Fischer, p = probabilité



**Figure D.8 Tests de t Student suite aux interactions significatives entre les semaines et le traitement mycorhizien et les semaines et le cultivar de l'ANOVA de la concentration en protéines des racines des plants de la première expérience (Tableau 6). D'après l'ajustement de Bonferroni pour les 7 différentes semaines  $\alpha = 0.05/14 = 0.00357$ . Une probabilité  $< 0.00357$  indique que le traitement mycorhizien ou le cultivar a un effet significatif.**

Semaines	dl	Mycorhizes		Cultivar	
		F	p	F	p
2	1	0.02	0.8817	6.85	0.0225
3	1	2.04	0.1766	22.67	0.0004
4	1	13.23	0.0030	8.08	0.0139
5	1	13.69	0.0027	0.33	0.5766
6	1	0.00	0.9966	0.71	0.4174
7	1	3.13	0.1025	1.64	0.2250
10	1	3.94	0.0727	6.17	0.0303

dl = degrés de liberté, F = distribution de Fischer, p = probabilité

**Figure D.9 Test de Tukey-Kramer HSD suite à l'effet significatif des semaines pour l'ANOVA de la concentration en protéines des feuilles des plants de la seconde expérience (Tableau 7). Les valeurs positives indiquent des paires de moyennes significativement différentes.**

Semaines	3	5	7
3	-6.5919	-4.3918	19.4464
5	-4.3918	-6.5919	17.2463
7	19.4464	17.2463	-6.5919

**Figure D.10** Tests de t Student suite à l'interaction significative entre les semaines et le traitement mycorhizien de l'ANOVA de l'activité de la PAL des plants de la première expérience (Tableau 8). D'après l'ajustement de Bonferroni pour les 7 différentes semaines  $\alpha = 0.05/7 = 0.007$ . Une probabilité  $< 0.007$  indique que le traitement mycorhizien a un effet significatif.

Semaines	dl	F	P
2	1	0.75	0.4021
3	1	0.09	0.7628
4	1	5.32	0.0369
5	1	9.43	0.0083
6	1	0.10	0.7574
7	1	9.59	0.0085
10	1	2.65	0.1293

dl = degrés de liberté, F = distribution de Fischer, p = probabilité

**Figure D.11** Test de Tukey-Kramer HSD suite à l'effet significatif des semaines pour l'ANOVA de l'activité de la PAL des plants de la seconde expérience (Tableau 9). Les valeurs positives indiquent des paires de moyennes significativement différentes.

Semaines	3	5	7
3	-8.13962	-1.88550	2.67520
5	-1.88550	-8.13962	8.92931
7	2.67520	8.92931	-8.13962

**Figure D.12** Test de Tukey-Kramer HSD suite à l'effet significatif des semaines pour l'ANOVA de l'activité de la peroxydase des plants de la première expérience (Tableau 10). Les valeurs positives indiquent des paires de moyennes significativement différentes.

<b>Semaines</b>	<b>3</b>	<b>5</b>	<b>7</b>
<b>3</b>	-92.3449	-30.2563	0.4307
<b>5</b>	-30.2563	-92.3449	62.5193
<b>7</b>	0.4307	62.5193	-92.3449

**Figure D.13** Test de Tukey-Kramer HSD suite à l'effet significatif des semaines pour l'ANOVA de l'activité de la peroxydase des plants de la seconde expérience (Tableau 11). Les valeurs positives indiquent des paires de moyennes significativement différentes.

<b>Semaines</b>	<b>3</b>	<b>5</b>	<b>7</b>
<b>3</b>	-108.777	-57.424	26.772
<b>5</b>	-57.424	-112.344	-28.177
<b>7</b>	26.772	-28.177	-108.777

**Figure D.14** Tests de t Student suite à l'interaction significative entre les semaines et le cultivar de l'ANOVA de la concentration en phénols solubles des feuilles des plants de la première expérience (Tableau 12). D'après l'ajustement de Bonferroni pour les 7 différentes semaines  $\alpha = 0.05/7 = 0.007$ . Une probabilité  $< 0.007$  indique que le cultivar a un effet significatif.

<b>Semaines</b>	<b>dl</b>	<b>F</b>	<b>P</b>
2	1	42.42	0.0000
3	1	9.64	0.0078
4	1	9.47	0.0082
5	1	2.79	0.1170
6	1	1.27	0.2823
7	1	1.98	0.1813
10	1	0.63	0.4390

dl = degrés de liberté, F = distribution de Fischer, p = probabilité

**Figure D.15** Tests de t Student suite à l'interaction significative entre les semaines et le traitement mycorhizien de l'ANOVA sur la concentration en phénols solubles des feuilles des plants de la seconde expérience (Tableau 14). D'après l'ajustement de Bonferroni pour les 3 différentes semaines  $\alpha = 0.05/3 = 0.017$ . Une probabilité  $< 0.017$  indique que le traitement mycorhizien a un effet significatif.

<b>Semaines</b>	<b>dl</b>	<b>F</b>	<b>P</b>
3	1	0.02	0.9021
5	1	8.20	0.0125
7	1	6.65	0.0219

dl = degrés de liberté, F = distribution de Fischer, p = probabilité