

CYTOLOGIE VÉGÉTALE. — *Cytologie et évolution de Rhizobium cowpea dans le nodule d'Arachide (Arachis hypogea)*. Note (\*) de M<sup>lle</sup> Marie-Anna Aufferve, transmise par M. Roger Buvat.

La fixation de l'azote par les Légumineuses reste un problème biologique important, tant par ses applications agronomiques que par ses implications biochimiques et ultrastructurales. Les études de nodosités de plusieurs espèces mettent en évidence des différences assez sensibles quant à la cytologie et l'évolution des bactéries tandis qu'elles en soulignent l'unité de fonctionnement enzymatique. Parmi ces recherches très peu ont été consacrées aux Légumineuses tropicales (<sup>3</sup>). D'autre part le mode d'infestation de l'Arachide est très particulier, les nodules ne se formant qu'à l'aisselle des racines secondaires et non après contamination de poils absorbants. Pour ces différentes raisons et afin de compléter nos propres recherches sur la fixation de l'azote par l'Arachide *in situ* nous avons étudié la cytologie ultrastructurale d'un nodule efficient. La zone méristématique de l'apex nodulaire ne présentant pas de différences notables avec d'autres espèces [(<sup>4</sup>), (<sup>15</sup>)] nous nous sommes volontairement limitée à l'étude du tissu infecté : zones d'invasion, de multiplication bactérienne, de fixation de l'azote, de dégénérescence.

**MATÉRIEL ET MÉTHODES.** — Les plants d'Arachide var. 28206 (IRAT, Sénégal) sont contaminés par une suspension de *Rhizobium cowpea*, souche CB 756. Les nodules sont récoltés 10 et 20 jours après leur apparition.

**Fixation.** — 2 h 30 à 3 h dans du glutaraldéhyde à 4 % tamponné à pH 7,2 avec du cacodylate de sodium 0,2 M, puis post-fixation de 1 h dans du tétr oxyde d'osmium à 1 % ; déshydratation dans l'acétone et inclusion dans l'« araldite » M. Observation après contraste par le permanganate de potassium.

**Epreuve de Thiéry** pour la mise en évidence des polysaccharides, adaptée à la cellule végétale par Roland et Sandoz [(<sup>13</sup>), (<sup>14</sup>)] : incubation de 21 h dans la thiocarbohydrazide à 0,2 % puis de 30 mn dans le protéinate d'argent à 1 %, après une oxydation de 45 mn par l'acide périodique à 1 %.

**RÉSULTATS.** — 1. *Zone d'infestation.* — Les cordons infectieux (*fig. 1*), qui s'infiltrant dans les parois pectocellulosiques des cellules de l'hôte, sont formés d'un mucilage translucide englobant les bactéries. Il est généralement admis que ce mucilage est sécrété par le *Rhizobium*. Le cordon est cerné d'une couche plus dense, vraisemblablement constituée de cellulose ou d'hémicellulose, appartenant à la paroi végétale primaire, écartelée par la poussée du cordon infectieux. Selon Nutman (<sup>11</sup>) la paroi bordant le cordon serait une invagination de la paroi cellulaire au point de pénétration alors que d'autres auteurs la considèrent comme la manifestation d'une réaction de défense de la cellule végétale envers un organisme étranger. Quelle que soit son origine cette bande est elle-même bordée par le plasmalemma des cellules voisines. Le cordon infectieux n'a été décelé que dans l'espace intercellulaire comme dans les nodules de Lupin (<sup>10</sup>). Les bactéries sont en forme de bacille de 1,6 sur 0,4  $\mu$  en moyenne, sans flagelle visible. La paroi, de type Gram<sup>-</sup>, est nettement apparente tandis que la membrane cellulaire est plus difficilement discernable étant donné la densité du cytoplasme, très riche en ribosomes. Le nucléoïde, en posi-

13 NOV. 1974

D. R. S. T. O. M. Ex 1

Collection de Référence

n° 7159 Bio Sol

tion centrale, apparaît sous forme de plage claire parcourue par un fin réseau ; des granulations denses de 0,1 à 0,14  $\mu$  y sont fréquemment incluses.

2. *Zone de libération et de multiplication bactériennes.* — Les images obtenues suggèrent une libération bactérie par bactérie ou tout au moins par petits groupes car nous n'avons jamais observé plus de 2 ou 3 bactéries par vacuole (*fig. 2*) encore est-il difficile de préciser s'il ne s'agit pas de bactéries venant de se diviser. La couche cellulosique s'amenuise et les bactéries viennent au contact du plasmalemm qui s'invagine pour former de véritables vacuoles de séquestration autour des *Rhizobium*. C'est à Bergersen et Briggs <sup>(1)</sup> que revient le mérite d'avoir les premiers suggéré l'origine plasmalemmique de la membrane de séquestration. Cette hypothèse, mise en doute par Dart et Mercer <sup>(2)</sup> et Jordan, Grinyer et Coulter <sup>(9)</sup>, était reprise par Dixon <sup>(6)</sup> puis par Goodchild et Bergersen <sup>(8)</sup> qui montraient sans équivoque possible la continuité existant entre le plasmalemm et la membrane de séquestration. Les travaux récents de Truchet <sup>(15)</sup> qui pour la première fois appliquait l'épreuve de Thiéry à ce matériel, puis de Fernandez-Arias <sup>(7)</sup>, confirmaient les résultats antérieurs : la membrane de séquestration comme le plasmalemm sont intensément soulignés par un précipité de sels d'argent (*fig. 4*). Truchet note d'autre part qu'une synthèse importante permettant l'élaboration d'un matériel membranaire en quantité suffisante est indispensable. Une fois libérées, les bactéries envahissent peu à peu tout le cytoplasme de la cellule de l'hôte. Cet accroissement du nombre de bactéries est en général considéré comme résultant d'une phase d'active division. Cependant, dans nos préparations nous n'avons observé que très peu de bactéries en division. D'autre part il est difficile de penser à un apport dû à de nouveaux cordons car chez l'Arachide comme chez le Soja la zone d'invasion est fugace et, dès le 10<sup>e</sup> jour, on note une nette diminution des cordons d'infection. Le nombre de dictyosomes et de mitochondries augmente mais ils restent dispersés dans le cytoplasme végétal. Le réticulum endoplasmique, et l'observation est valable pour toutes les zones du nodule, est fréquemment juxtaposé aux vacuoles de séquestration (*fig. 3*), avec lesquelles

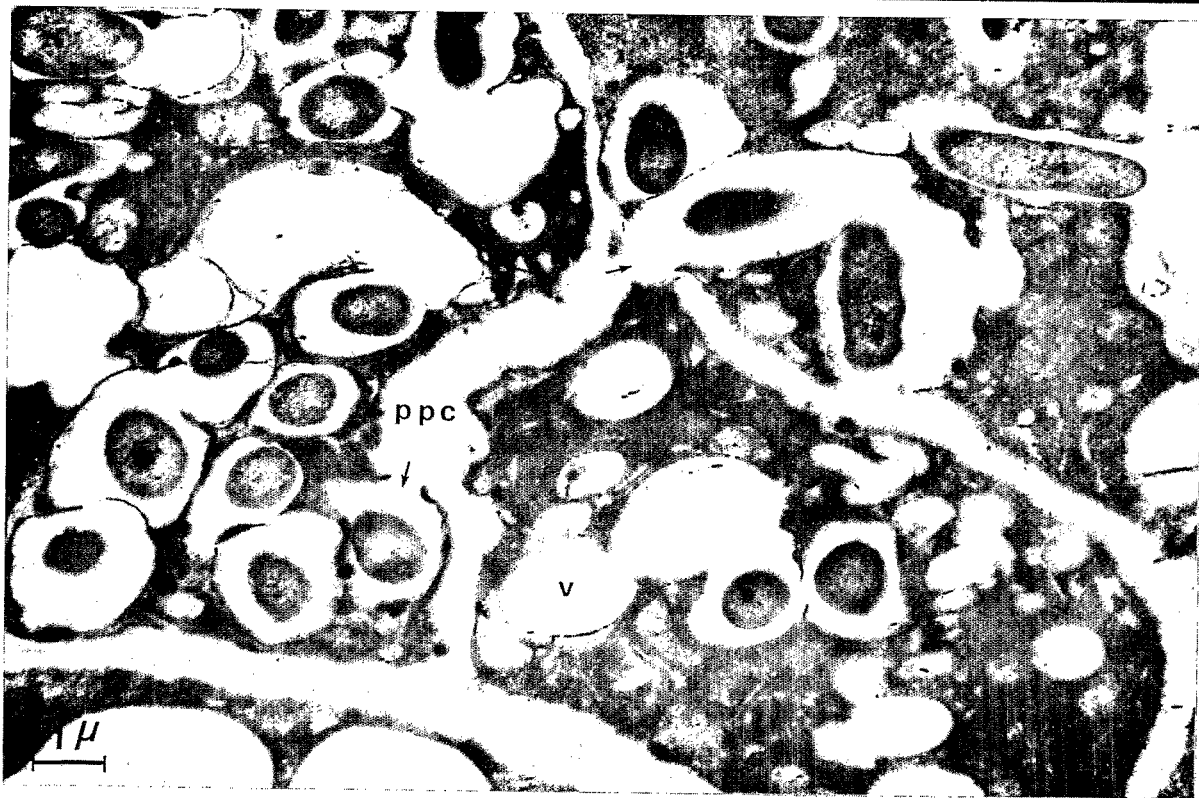
#### EXPLICATION DES PLANCHES

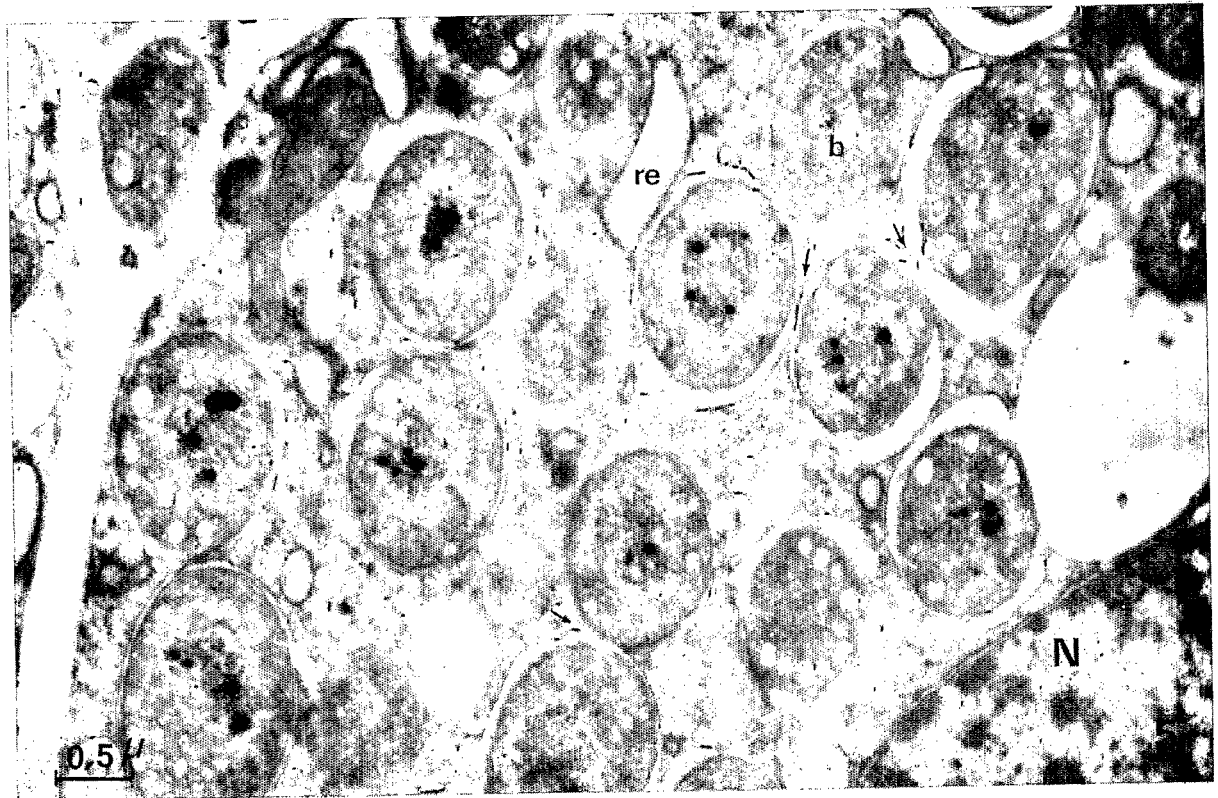
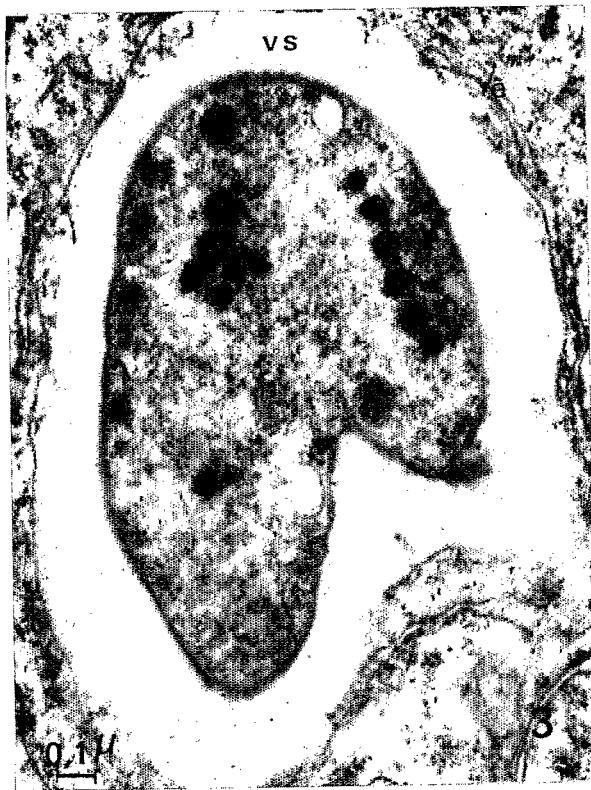
##### Planche I

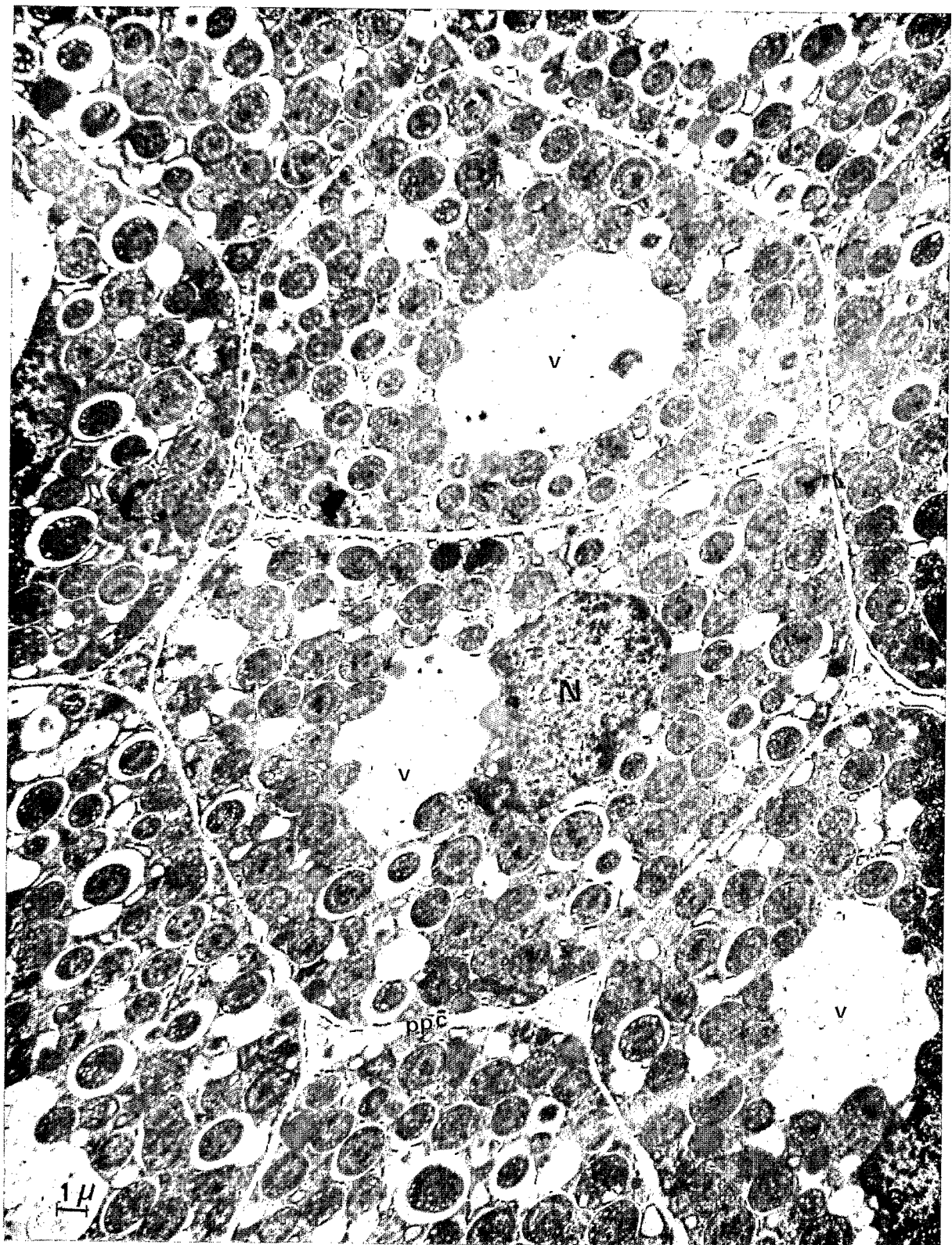
- Fig. 1. — Cordon infectieux dans une paroi pectocellulosique. Bactéries (b) libres dans le mucilage (mu), limité par une couche cellulosique (c). On distingue la paroi bactérienne (flèche), le nucléoïde (n), les grains d'inclusions (i) (G  $\times$  22 500).
- Fig. 2. — Vue générale montrant la libération de bactéries (flèches) dans une cellule comportant de nombreuses vacuoles (V) ; ppc, paroi pectocellulosique (G  $\times$  18 750).

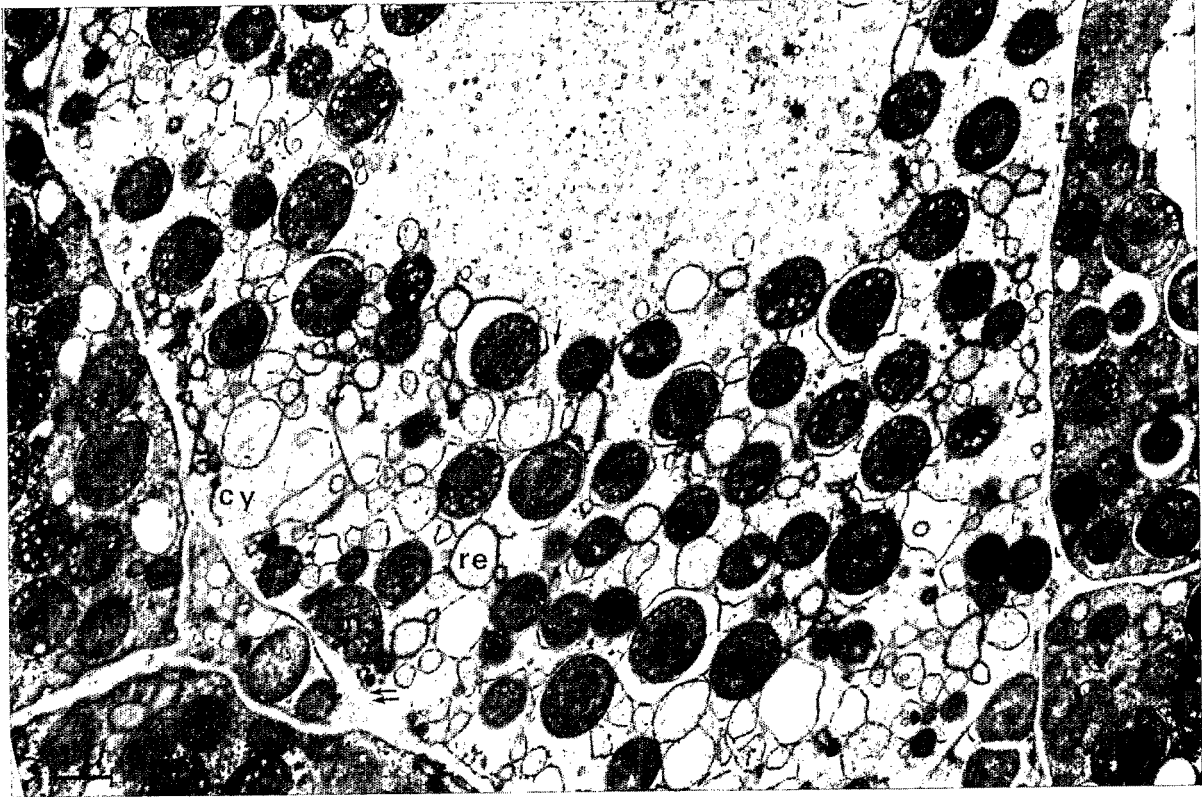
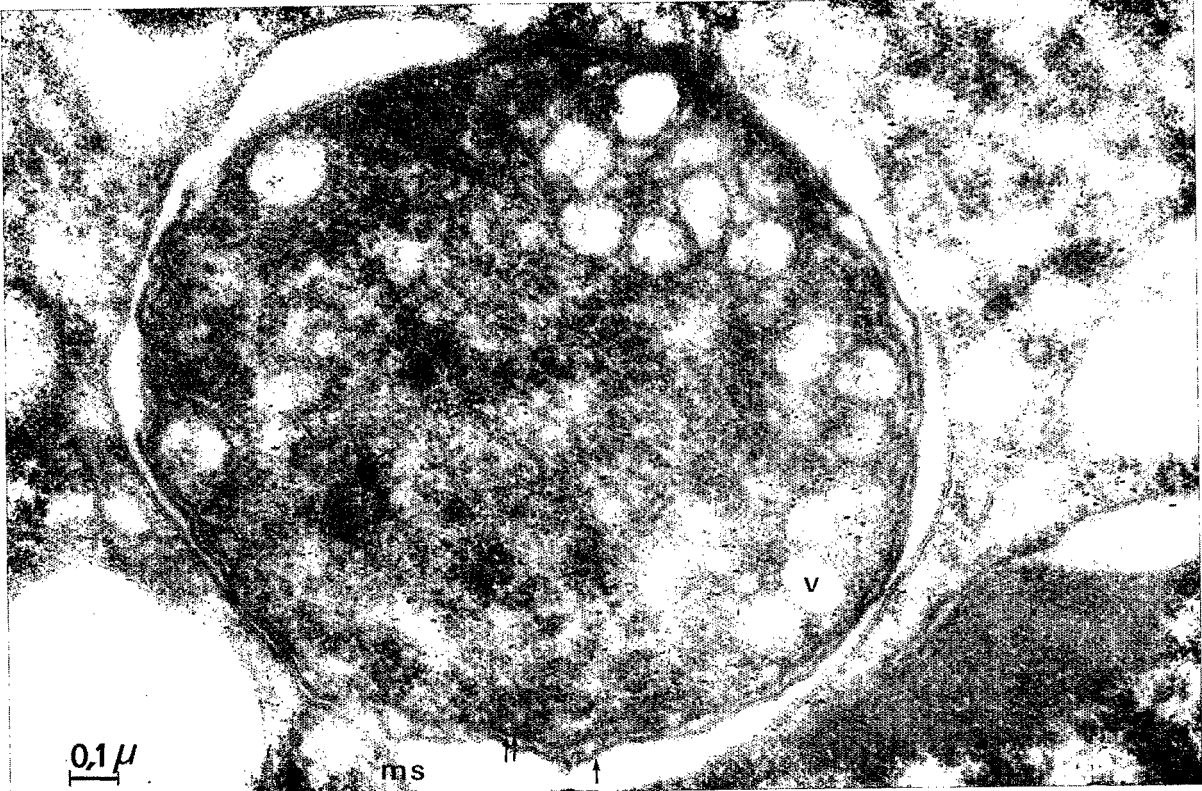
##### Planche II

- Fig. 3. — Bactérie en poire dans sa vacuole de séquestration (vs) entourée de réticulum endoplasmique (re). Noter les inclusions denses alignées (G  $\times$  50 000).
- Fig. 4. — Epreuve de Thiéry montrant le précipité abondant de sels d'argent sur la membrane de séquestration (ms) et le faible marquage au niveau du réticulum endoplasmique (re) (G  $\times$  62 250).
- Fig. 5. — Zone à bactéroïdes vacuolisés (b). Le réticulum endoplasmique forme des ampoules (re) ; N, noyau. Noter l'accolement de deux membranes de séquestration voisines (flèche) (G  $\times$  25 000).









## Planche III

Fig. 6. — Vue générale des cellules à bactéroïdes ; N, noyau ; v, vacuole ; ppc, paroi pectocellulosique (G  $\times$  4 375).

## Planche IV

Fig. 7. — Détail d'un bactéroïde vacuolisé montrant la membrane de séquestration (ms) la paroi bactérienne (flèche) la membrane bactérienne (double flèche), les inclusions denses, les vacuoles (v) (G  $\times$  73 750).

Fig. 8. — Cellule en voie de dégénérescence ; tonoplaste (flèche) et plasmalemme (double flèche) fragmentés, ampoules du réticulum endoplasmique (re), cytoplasme (cy) appauvri, mitochondries (m) très rares (G  $\times$  8 750).

il entre parfois en contact en perdant ses ribosomes. Cette configuration suggère un échange, soit d'informations, soit de produits de synthèse ou de catabolisme. En effet l'extraordinaire fonctionnement enzymatique résultant de l'association de la bactérie et de la cellule-hôte (acquisition de la nitrogénase, synthèse de la léghémoglobine, augmentation des processus d'oxydo-réduction) implique un complexe problème d'informations réciproques qui n'a pas encore été abordé. Ce stade est marqué en outre par un polymorphisme bactérien : formes effilées, en X, en Y ou en poire (*fig. 3*). On retrouve par contre la même structure que chez les bactéries encore dans le cordon. Les granules denses, en nombre variable, sont reliés entre eux par un réseau d'épaisses fibrilles et se classent en deux catégories : les uns apparaissent homogènes sans structure visible, tandis que les autres se révèlent composés d'un agglomérat de petites particules (*fig. 3*). Bien que l'intense coloration suggère une nature lipidique, une digestion enzymatique de 6 h par la lipase n'a donné aucun résultat.

3. *Zone de fixation ou zone à bactéroïdes.* — Le terme de bactéroïde, donné originellement aux formes branchées des bactéries dans les nodules, continue d'être employé malgré son sens imprécis, nombre d'auteurs désignant actuellement par ce terme les formes fixatrices incapables de division, caractéristiques de la zone rouge du nodule (*fig. 5 et 6*). Or les formes branchées et fixatrices ne sont pas équivalentes et le plus souvent se succèdent au cours de la différenciation du nodule. Les seuls critères cytologiques ne suffisent donc pas et des réactions cytochimiques, en particulier la localisation d'une peroxydase basique révélatrice de la présence de léghémoglobine nous semblent indispensables à la distinction entre bactérie et bactéroïde. Effectuée sur notre matériel, une telle réaction révèle une activité enzymatique dans les dernières cellules de la zone de multiplication alors que ne sont pas encore intervenues les transformations morphologiques (résultats à paraître). Ces modifications interviennent donc après l'apparition d'une activité fixatrice et sont en fait l'annonce de la dégénérescence : les bactéries s'arrondissent et augmentent de volume (*fig. 5, 6, 7*), les fibrilles ont disparu, le nucléoïde est fragmenté dans le cytoplasme et de petites granulations qui pourraient provenir de la fragmentation des gros grains denses décrits précédemment sont éparses dans une zone riche en particules analogues aux ribosomes. Le trait le plus frappant est la présence de nombreuses vacuoles de 0,05 à 0,1  $\mu$  (*fig. 7*) dérivant vraisemblablement de la membrane bactérienne (<sup>3</sup>).

En augmentant la surface de contact des membranes ce système intracytoplasmique, caractéristique de cette zone, pourrait jouer chez les bactéroïdes le même rôle que chez l'*Azotobacter* dans les processus d'oxydo-réduction <sup>(12)</sup>. Fernandez-Arias <sup>(7)</sup> a d'ailleurs localisé une peroxydase active à pH 6 au niveau de ces structures. Le réticulum endoplasmique des cellules-hôtes forme des boursouffures qui parfois se coupent des régions lamellaires ; seule la présence de leurs ribosomes permet alors de retrouver leur origine (fig. 5).

4. *Zone de dégénérescence.* — Le cytoplasme végétal (fig. 8) se lyse et devient très clair ; sur nos préparations le tonoplaste et le plasmalemme apparaissent souvent fragmentés tandis que les organites cellulaires ne sont plus visibles, et il ne reste plus, autour des bactéroïdes plus résistants, que de nombreuses ampoules réticulaires et des vésicules vides. Dans un stade ultérieur le cytoplasme des bactéroïdes s'amenuise selon un processus rappelant une autolyse ou donne parfois des formes vides géantes comme dans le cas des *Pseudomonas* <sup>(7)</sup>.

En conclusion l'évolution du *Rhizobium cowpea* dans les différentes zones du nodule d'Arachide, avec ses principaux traits caractéristiques, libération bactérie par bactérie, inclusions denses chez les bactéries, bactéroïdes vacuolisés, réticulum endoplasmique de l'hôte dilaté en ampoules, indique bien les différences cytologiques existant entre les espèces de Légumineuses, même au sein d'un même groupe d'inoculation contrairement à la conclusion émise par Dart et Mercer <sup>(5)</sup>. D'autre part l'activité fixatrice manifestée par des bactéroïdes présentant des modifications de structure qui sont en fait celles d'une bactérie en voie de dégénérescence (l'aptitude de *Rhizobium* à accomplir tout son cycle en dehors de toute plante) ainsi que la mort des cellules végétales composant le nodule nous conduisent à nous demander s'il s'agit bien d'une véritable symbiose et non point d'une association d'un genre nouveau qui verrait un organisme supérieur parasite d'une bactérie, la plante commandant et détournant à son profit l'activité enzymatique acquise par *Rhizobium* au sein du nodule.

(\*) Séance du 23 juillet 1973.

(1) F. BERGERSEN et M. J. BRIGGS, *J. Gen. Microb.*, 19, 1958, p. 482.

(2) P. J. DART et F. V. MERCER, *Arch. Mikrob.*, 46, 1963, p. 382.

(3) P. J. DART et F. V. MERCER, *Arch. Mikrob.*, 47, 1963, p. 1.

(4) P. J. DART et F. V. MERCER, *Proced. Linnean soc. NSW*, 90, 1965, p. 252.

(5) P. J. DART et F. V. MERCER, *J. Bact.*, 91, 1966, p. 314.

(6) R. O. D. DIXON, *Arch. Mikrob.*, 48, 1964, p. 166.

(7) H. FERNANDEZ-ARIAS, *Thèse spécialité*, Rennes, 1972.

(8) J. GOODCHILD et F. BERGERSEN, *J. Bact.*, 92, 1966, p. 204.

(9) D. C. JORDAN, I. GRINYER et W. H. COULTER, *J. Bact.*, 86, 1963, p. 125.

(10) D. C. JORDAN et I. GRINYER, *Can. J. Microb.*, 11, 1965, p. 721.

(11) P. S. NUTMAN, *Biol. review*, 31, 1956, p. 109.

(12) J. PANGBORN, A. G. MARR et S. A. RABRISCH, *J. Bact.*, 84, 1962, p. 669.

(13) J. C. ROLAND et D. SANDOZ, *J. Microscopie*, 8, 1969, p. 349.

(14) J. P. THIERY, *J. Microscopie*, 6, 1967, p. 987.

(15) G. TRUCHET, *Comptes rendus*, 270, Série D, 1970, p. 3047.

Institut de Cytologie  
et de Biologie Cellulaire,  
Laboratoire associé au CNRS n° 179,  
Centre Universitaire de Luminy,  
13288 Marseille Cedex 2.