

50376
1964
58



UNIVERSITÉ DE LILLE
FACULTÉ DES SCIENCES

50376
1964
58

Mémoire présenté en vue de l'obtention du

**DIPLOME D'ÉTUDES SUPÉRIEURES
DE SCIENCES NATURELLES**

Les bactéries (détermination et répartition)

dans les cellules

du grain et de la plantule de blé

Soutenu à Lille, en Février 1964

par Jacqueline BEAUFILS

Il y a des bactéries dans les grains de blé, des travaux précédents l'ont établi (5). Cette constatation pose immédiatement quelques problèmes dans différents domaines (origine, transmission, rôle).

Que deviennent ces micro-organismes dans les premiers stades de la germination ? C'est l'une des premières questions qui naturellement se pose et qui constitue le point de départ de ces travaux.

Si l'on tente, tout-à-fait théoriquement, de répondre à cette question on a le choix entre deux hypothèses : ou bien les bactéries restent dans les cellules qui les hébergent dans le grain et disparaissent au moment de la digestion des réserves, ou bien, par un mécanisme qui reste à élucider, elles migrent dans les divers organes au fur et à mesure qu'ils se développent. Dans ce cas n'ont-elles pas une prédilection particulière pour tel organe, tel tissu ou tel groupe de cellules. Enfin, puisqu'on a pu détermi-

ner plusieurs espèces bactériennes présentes dans le grain, il est logique de se demander si toutes ces espèces sont équivalentes ou si l'une d'entre elles semble affecter une localisation spéciale.

Pour aborder ces problèmes, nous avons dû mettre au point une technique de germination stérile; puis faire l'inventaire des espèces présentes dans le grain selon les techniques habituelles de la bactériologie afin de comparer avec celles que nous pourrions rencontrer dans les différents organes. Enfin, dans une dernière partie, des examens cytologiques viennent renforcer et compléter les constatations bactériologiques.

I - Recherche d'une technique de germination stérile :

La mise en évidence de micro-organismes dans le caryopse de blé nécessite, à la base de toute manipulation, la suppression complète et radicale de tous les germes d'origine extérieure au grain. Nous devons partir d'un caryopse rigoureusement stérile. Le problème posé par ce travail a été de conserver un pouvoir germinatif convenable à des grains stérilisés par immersion dans un antiseptique.

Nous avons fait appel à deux antiseptiques classiques :

- le sublimé ou chlorure de mercure,
- l'hypochlorite de sodium.

Nous y avons immergé des grains pendant des temps variables, à différentes concentrations. Compte tenu de la modification du pouvoir germinatif de ces grains, nous avons finalement opté pour une technique que nous utilisons tout au long de notre travail.

A. Stérilisation des grains de blé :

- Technique :

Pour rendre les grains plus "mouillables"

par la solution de l'antiseptique où nous les plongeons, nous les passons, au préalable, dans une solution d'alcool. Ceci évite la formation de bulles d'air autour du grain, donc favorise la stérilisation. Après séjour dans l'antiseptique, les grains sont rincés à l'eau stérile, puis chacun est introduit dans un tube à essais contenant un milieu liquide nutritif favorable au développement d'éventuelles bactéries. La composition de ce milieu est la suivante :

- extrait de viande 10g
- peptone bactériologique 10g
- chlorure de sodium 5g
- glucose 20g
- eau distillée 1000cc

Le milieu a été stérilisé par passage à l'autoclave, à 120°, sous une atmosphère, pendant 20 minutes. Les tubes contenant les grains sont portés à l'étuve, à 37°, pendant 48 heures.

Au bout de ce temps, nous déterminons pour chaque condition de traitement (concentration, durée, nature de l'antiseptique) les pourcentages de grains ayant provoqué la pollution du milieu. Ils traduisent bien entendu, l'efficacité relative des différents traitements de stérilisation des caryopses;

- Résultats :

Nous faisons ce test de stérilité sur 50 grains environ, pour chaque cas. Nous résumons les résultats obtenus dans le tableau N° I (page 6). Il montre clairement que la stérilité absolue n'est assurée que pour une solution de mercurique de concentration égale à 0,2%, pour un temps minimum d'immersion d'une demi-heure. A la concentration de 0,1%, l'immersion doit durer une heure.

Nous remarquons également que l'hypochlorite de sodium, pourtant utilisé à forte concentration, ne donne pas de stérilité rigoureuse.

B. Pouvoir germinatif après stérilisation :

- Techniques :

Afin de vérifier le pouvoir germinatif des grains que nous avons stérilisés, nous faisons un test classique de germination.

Sur le fond d'une boîte de Pétri, nous déposons un papier filtre humide. Nous y mettons les grains de blé qui ont subi le passage à l'antiseptique : nous arrosons l'ensemble d'eau dis-

tillée, et nous portons en atmosphère chaude et humide. Quelques jours après, deux ou trois en général, la germination est en cours.

- Résultats :

Nous résumons les résultats obtenus dans le tableau N° II (page 6) analogue à celui que nous avons dressé pour le test de stérilité.

Ce tableau indique la nocivité d'un séjour d'une heure dans le sublimé à 0,2% pour les grains de blé : dans ce cas, le pouvoir germinatif faiblit considérablement. Les autres cas étudiés sont plus ou moins satisfaisants.

L'hypochlorite de sodium, par contre, conserve au caryopse un bon pouvoir germinatif : après une heure d'immersion, on a encore développement de 85% des grains.

Tableau I

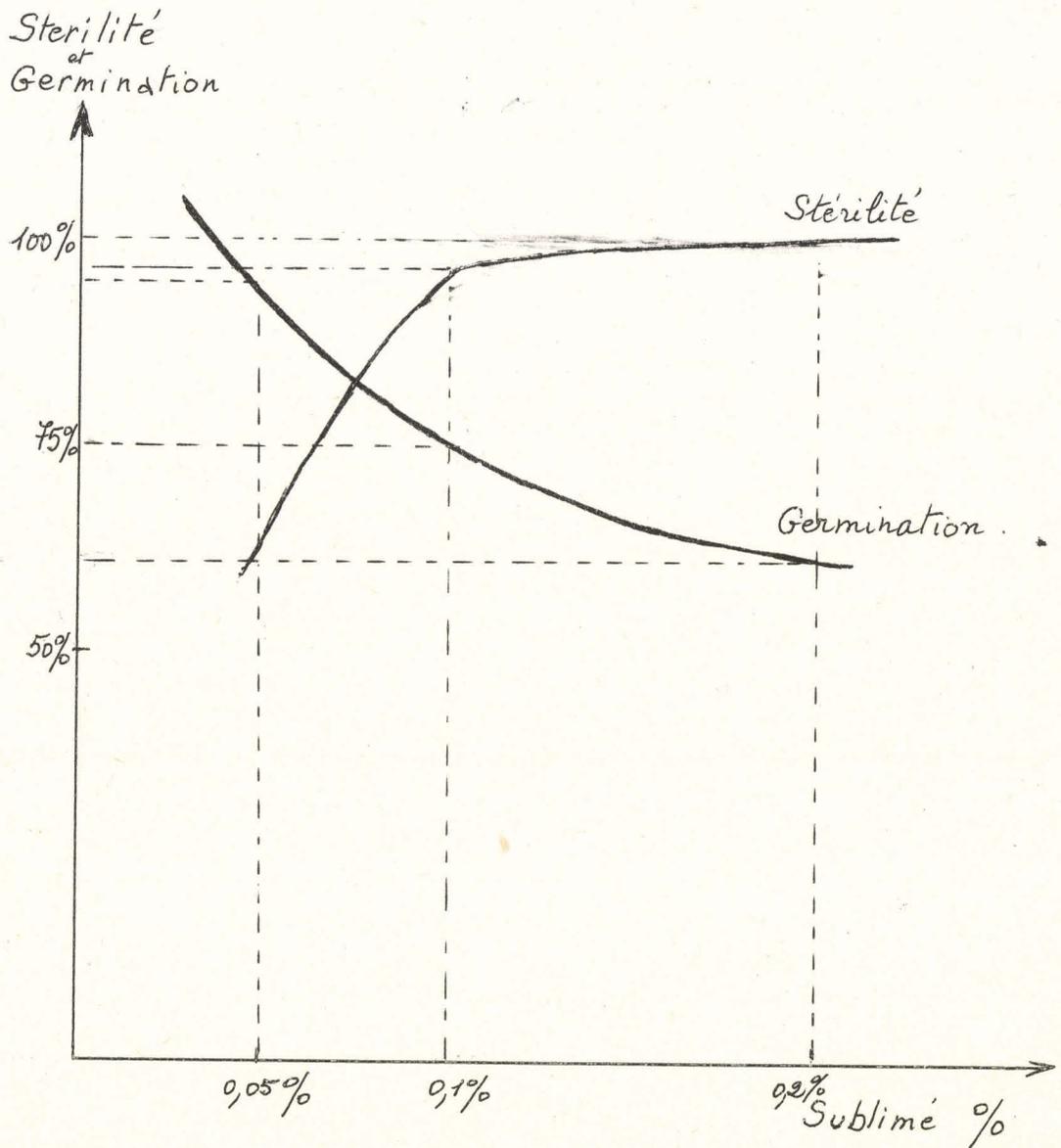
SUBLIME	Temps d'immersion.	Stérilité
0,2%	I h.	100%
	I/2 h.	100%
0,1%	I h.	100%
	I/2 h.	94,7%
0,05%	I h.	94,7%
	I/2 h.	75%
HYPOCHLORITE DE SODIUM.		Stérilité
3g/l	I h.	85%
	I/2h.	75%

Test de stérilitéTableau II

SUBLIME	Temps d'immersion.	Germination
0,2%	I H.	8%
	I/2 h.	60%
0,1%	I h.	40%
	I/2 h.	75%
0,05%	I h.	88%
	I/2h.	90%
HYPOCHLORITE DE SODIUM.		Germination.
3g/l	I h.	85%
	I/2h.	90%

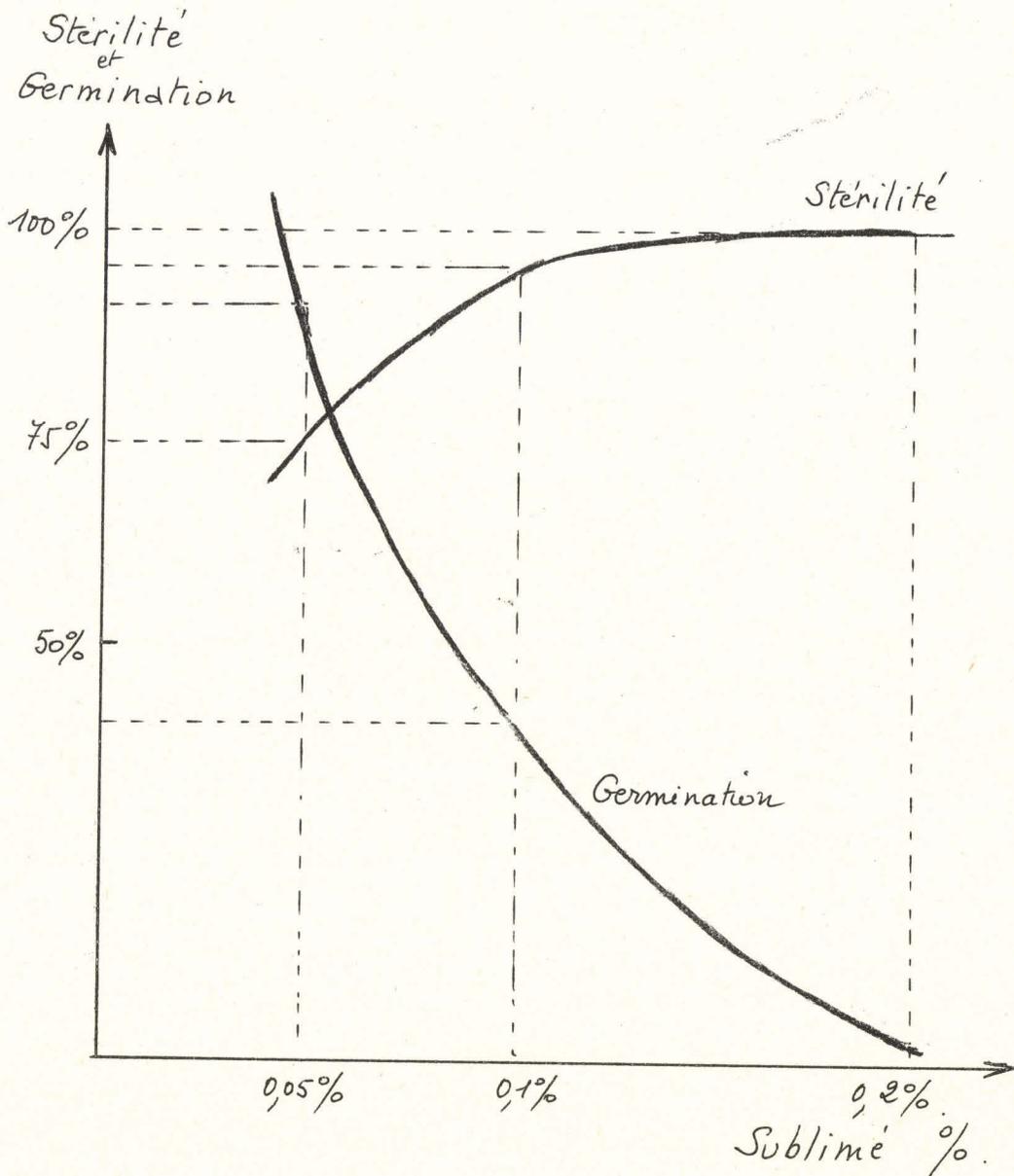
Test de germination.

Courbe 1



Variations des pourcentages de stérilité et de germination
après $\frac{1}{2}$ h. de séjour dans le sublimé

Courbe 2



Variations des pourcentages de stérilité et de germination
après 1^h de séjour dans le sublimé

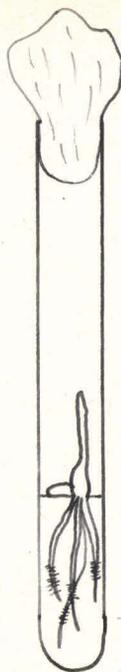
C. Choix de la technique :

La comparaison des 2 tableaux I et II, et les courbes I et 2 qui les traduisent, précisent les rapports qui relient la durée d'immersion dans des antiseptiques de concentrations variables, la stérilité obtenue, et le pouvoir germinatif. L'examen des courbes permet de constater que le séjour dans le sublimé à 0,2% pendant une demi-heure, en assurant une stérilité absolue (100%), conserve au grain un pouvoir germinatif correct (60%). C'est la technique que nous avons retenue.

D. Milieu de germination :

Pour écarter toute contamination bactérienne au cours de leur développement, nous faisons germer les caryopses de blé dans des tubes à essais, sur milieu de Knopp gélosé et sucré :

germination stérile



Ca (NO ₃) ₂ , 4 H ₂ O	0,5g
K NO ₃	0,125g
Mg SO ₄ , 7 H ₂ O	0,125g
K H ₂ PO ₄	0,125g
glucose	20g
Agar Agar	15g
eau distillée	1000cc

Ce milieu est réparti, à raison de 5cc, dans les tubes, bouchés par un tampon d'ouate, qui sont passés à l'autoclave (120° - 1 atmosphère - 20 minutes). Après refroidissement et solidification, un grain, préalablement stérilisé comme nous l'avons indiqué ci-dessus, est déposé dans chaque tube, dans les conditions classiques d'asepsie (opération en chambre stérile, pinces rougies à la flamme, matériel passé à l'alcool).

Après deux ou trois jours, chaque grain gonfle, tandis que de la vapeur d'eau se condense sur les parois du tube. La plantule se développe (fig. I ci-contre) rapidement : le coléoptile atteint une taille voisine de 3cm au bout d'une huitaine de jours; des racines longues et fines fixent la jeune plante au substrat.

F. Conclusion.

Des grains ayant séjourné une demi-heure dans le sublimé à 0,2% présentent à la fois une stérilité rigoureuse et un pouvoir germinatif correct : le milieu sur lequel ils se sont développés ne montre aucune colonie bactérienne. La jeune plante, obtenue à l'abri de tout contact bactérien, va nous servir de matériel pour les travaux ultérieurs.

II - Recherches Bactériologiques au cours de la germination.

Après avoir prélevé les tiges et les racines des jeunes plants de blé développés dans des conditions stériles, nous avons étudié le peuplement bactérien que ces organes étaient susceptibles d'héberger. Nous avons eu recours, pour ce travail, au broyage stérile des tissus. Nous avons isolé, puis identifié les espèces qui s'y trouvaient.

A. Isolement et culture des souches :

Nous avons travaillé sur 3 organes :

- le grain avant toute germination,
- la tige, 3 à 4 jours après la
- la racine. sortie du coléoptile.

I. Techniques :

Toutes les manipulations sont faites en chambre stérile, au-dessus de la flamme, avec des instruments soigneusement stérilisés. Le broyage a pour but de libérer les micro-organismes éventuellement hébergés dans les tissus sains des organes étudiés. Il est effectué dans un milieu liquide favorable au développement bactérien, dont la composition a été donnée ci-dessus (page 8). Ce milieu, stérilisé par passage à l'autoclave, est réparti dans les tubes spéciaux du broyeur.

- isolement des souches :

Quelles sont ces bactéries ?

Pour résoudre ce problème, il faut d'abord isoler les différentes espèces que l'organe pouvait héberger et que nous avons libérées. Nous commençons donc une goutte du broyat diluée dans

l'eau stérile (1 goutte pour 5cc) à la surface d'un milieu nutritif glucosé, gélosé, contenu dans des boîtes de Pétri.

Chaque espèce va s'y développer en donnant des colonies d'aspects différents. Il sera alors facile de prélever chaque souche et de la ré-ensemencer sur une nouvelle boîte pour contrôler l'efficacité de l'isolement.

Nous avons remarqué que le taux de glucose incorporé au milieu contenu dans les boîtes de Pétri influe sur la facilité de développement de la souche. Un excès de glucose provoque une acidification du milieu nuisible à la souche cultivée.

= Culture des souches :

Les colonies isolées sur boîte de Pétri sont mises en culture sur tubes inclinés. Le milieu contenu dans ces tubes a la même composition que celui des boîtes de Pétri. L'ensemencement se fait selon la méthode des stries. Ainsi obtenue, chaque souche peut se conserver plusieurs semaines, voire plusieurs mois, à la température ambiante. Il suffira, au bout de ce temps, de repiquer la culture sur un milieu neuf, pour conserver celle-ci indéfiniment.

2 - Résultats :

a) présence de bactéries :

Après avoir broyé une quarantaine de grains, tiges et racines, nous avons isolé huit espèces différentes de micro-organismes; nous les conservons sur tubes inclinés. Puisque toute source de pollution d'origine extérieure est supprimée, nous pouvons en déduire la présence des bactéries dans les tissus des organes étudiés.

b) étude comparative des populations bactériennes dans les divers organes étudiés :

Le broyage d'un organe ne provoque une pollution du milieu que si des cellules hôtes ont été touchées par cette opération. Dans le cas contraire, elles ne peuvent évidemment pas libérer les bactéries

Si l'organe contient peu de cellules infestées, le broyage de 30 secondes ne suffit pas toujours pour libérer les micro-organismes. Si au contraire les tissus sont riches en bactéries, les chances de libérer celles-ci augmentent considérablement. Par déduction, nous pouvons, en étudiant le pourcentage des broyats pollués, comparer très approximativement les densités respectives des populations hébergées par les tiges, racines et grains.

- les grains :

Tous les broyats de grain montrent un développement bactérien : trouble ou voile. Ceci tend à prouver que les cellules infestées sont nombreuses.

- les tiges :

Le broyat d'une tige n'est resté stérile que dans 10% des cas. Le peuplement bactérien est donc important dans ces tissus.

Nous avons remarqué que nous libérons les micro-organismes plus facilement si nous nous adressons à des plantes dont le coléoptile atteint environ 2cm, avant qu'il ne soit percé par la tige.

- les racines :

Il nous est souvent arrivé d'obtenir des broyats stériles quand nous étudions les jeunes racines. Le broyage de 30 secondes ne suffit souvent pas pour libérer les bactéries hébergées dans les tissus. La prolongation de la durée du broyage amène à coup sûr ce développement bactérien. Cette opération aboutit à la dissociation totale des tissus qui constituent l'organe; on peut considérer que toutes les cellules dans ce cas ont été touchées.

B. Détermination des bactéries isolées :

Après avoir isolé les souches bactériennes hébergées par le blé, nous avons cherché à les identifier. Dans ce but, nous leur avons fait subir trois tests :

- examen sur boîte de Pétri,
- culture sur tranche de pommes de terre,
- ensemencement en gélatine par piqure verticale.

Ceci nous a permis une première identification de la souche, identification que nous avons confirmée par un test physiologique caractéristique de chacune.

I) Techniques utilisées :

a) Examen sur boîte de Pétri :

Nous le faisons après séjour des boîtes pendant 48 heures à l'étuve. Chaque espèce développe des colonies d'aspect caractéristique. Nous les décrivons ci-dessous.

b) Culture sur pomme de terre :

Sur le fond d'une boîte de Pétri, nous déposons une tranche de pomme de terre de 1cm d'épaisseur environ. Nous arrosons d'eau

distillée, et nous passons à l'autoclave.

c) Cultures sur gélatine :

Les souches sont ensemencées dans un milieu stérile de composition suivante :

peptone bactériologique	5g
extrait de levure	3g
gélatine	150g
eau distillée	1000cc.

On laisse imbiber le mélange 10 à 20 minutes avant de le stériliser à l'autoclave; puis on laisse reposer 20 minutes à moins de 20°.

On ensemence par piqure.

Les bactéries qui digèrent la gélatine, transforment la gelée ferme constituée par la gélatine, en un liquide. Cette liquéfaction peut s'effectuer de différentes façons : cupule, entonnoir, doigt de gant, cylindre, entonnoir avec ramifications.

L'observation se fait 8 jours après ensemencement au minimum.

d) Autres techniques :

Nous ne donnons pas ici les compositions de tous les milieux que nous avons utilisés; ceci a été fait dans le cadre de travaux précédents. Nous avons fait appel aux tests de la

lécithinase, des citrates, de la peptonisation, du glucose. Ils nous ont permis de vérifier l'identité des souches isolées.

2) Résultats.

Nous résumons les résultats obtenus pour chaque souche :

- Souche I.

- boite de Pétri : colonies circulaires, petites, fines, lisses.
- Pomme de terre : peu de prolifération, enduit fin et brillant.
- gélatine : liquéfaction en cupule.
- test caractéristique : glucose.

La souche I est donc Sarcina.

- Souche 2.

- boite de Pétri : colonies blanches, plates, rugueuses, irrégulières.
- pomme de terre : développement rapide et important d'un enduit épais.
- gélatine : liquéfaction en cylindre.
- Test caractéristique : lécithinase.

La souche 2 est donc Bacillus cereus.

- Souche 3.

- Boite de Pétri : colonies rondes, opaques, bombées, à stries rayonnantes.
- pomme de terre : développement peu important légèrement pigmenté.
- gélatine : liquéfaction nulle.

Ce dernier point représente le caractère physiologique déterminant de cette souche identifiée à Bacillus coagulans.

- Souche 4.

- Boite de Pétri : colonies circulaires, bombées, brunes, à surface lisse, noircit après quelques jours à l'étuve.
- pomme de terre : développement rapide d'un enduit épais qui noircit après quelques jours d'étuve.
- gélatine : liquéfaction en entonnoir.
- test physiologique caractéristique : citrates.

La souche 4 est donc le Bacillus pumilus.

- Souche 5.

- boite de Pétri : colonies rondes, fines, lisses, à fins prolongements d'aspect muqueux.

- pomme de terre : enduit épais très plissé, à pigmentation rosé typique.
- gélatine : liquéfaction en entonnoir.
- test physiologique caractéristique : amidon.

La souche 5 est donc Bacillus Licheniformis.

- Souche 6.

- boite de Pétri : colonies blanchâtres, plates, possédant une partie périphérique plus claire peu développée.
- pomme de terre : enduit blanchâtre, épais, à surface granuleuse.
- gélatine : liquéfaction en entonnoir.
- test physiologique caractéristique : peptonisation du lait.

La souche 6 est donc Bacillus cereus variété mycoïdes I.

- Souche 7.

- boite de Pétri : colonie blanchâtre, plate, possédant une partie périphérique granuleuse, à bords irréguliers.
- pomme de terre : développement analogue à celui de B. Cereus var. mycoïdes I mais moins

rapide.

- gélatine : liquéfaction en cylindre.
- test physiologique caractéristique : peptonisation du lait plus rapide que B. cereus var. mycoides I.

Nous avons donc le Bacillus cereus var. mycoides II.

- Souche 8.
 - boite de Pétri : colonies très plates, ternes, visqueuses, ovalaires ou circulaires, à contours nets.
 - pomme de terre : formation d'un enduit, visqueux, gluant, blanchâtre.
 - gélatine : liquéfaction en cylindre.

Nous avons affaire à une espèce indéterminée du genre Bacillus.

3) Conclusion :

Nous n'avons certainement pas isolé et déterminé toutes les souches bactériennes hébergées dans le blé, cependant nous pensons que celles qui s'y développent appartenant presque toutes à la famille des Bacillaceae le plus

souvent sont : *Bacillus cereus*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus cereus* var. *mycoïdes* I, *Bacillus cereus* var. *mycoïdes* II, *Sarcina*.

Ces différentes espèces ont été déjà mises en évidence chez de nombreux autres végétaux, tels que la betterave, le haricot, le maïs, la pomme de terre.

C. Résultats et conclusion de l'étude bactériologique :

- I. Nous retrouvons dans le grain toutes les souches isolées dans la racine et la tige. En outre, nous n'avons pas isolé du grain des souches non retrouvées dans les tiges et les racines. Les bactéries partent donc du grain pour se répartir dans la jeune plante au cours de la germination.
2. Si nous comparons les souches isolées d'une tige et d'une racine d'un même grain, nous voyons que le plus souvent elles sont différentes; nous avons donc voulu comparer les populations bactériennes des trois organes étudiés : tige, racine et grain. Nous avons pour cela broyé 35 grains, 35 tiges et 35

racines; les broyats se sont pollués pour 35 grains, 33 tiges et 18 racines; à partir de ces milieux pollués, nous avons isolé les souches, et calculé le pourcentage de présence de chaque espèce dans les divers organes. Ces chiffres sont groupés dans le tableau III : (page 22).

Bacillus cereus est isolé le plus fréquemment dans les trois organes; en outre, *Sarcina*, *B. Licheniformis*, *B. cereus mycoïdes I* se trouvent aussi dans les tiges, racines, et grains. Par contre, *B. coagulans*, *B. pumilus* et *B. cereus mycoïdes var. II* n'ont été observés dans aucune tige, mais se trouvent dans la racine et le grain. L'interprétation de ce dernier point pose le problème d'une éventuelle migration sélective des bactéries soit dans la tige, soit dans la racine; celle-ci est peut-être en rapport avec le rôle des micro-organismes dans l'évolution de la plante.

En conclusion, nous rappellerons que ces recherches, menées par une méthode bactériologique classique, nous apportent la preuve que le caryopse de blé héberge des bactéries qui se retrouvent dans la tige et la racine

TABLEAU III.

Souches	Grain	Racine	Tige
Sarcina	5,5%	9,9%	5,5%
B. Cereus	27,7%	44,4%	18,1%
B. coagulans	8,3%	0	12,1%
B. pumilus	5,5%	0	12,1%
B. Licheniformis	27,7%	22,2%	6,6%
B. cereus. Var. mycoïdes I	25%	5,5%	18,1%
B. cereus. Var. mycoïdes II	5,5%	0	9,9%
Bacillus (indéterminée)	2,7%	0	9,9%

Tableau de détermination des souches à partir des broyats pollués.

au cours du développement. L'étude d'une telle migration ne peut être suivie avec précision par le procédé du broyage car nous ne pouvons valablement nous adresser qu'à des organes ayant atteint une longueur minima de 2 à 3 centimètres. Cependant, il nous apparaît déjà que leur répartition est très inégale dans la tige et la racine : ce résultat peut être intéressant mais il nécessite cependant une étude complémentaire. Une localisation plus précise s'impose, pour nous permettre de savoir si les diverses régions de la tige et de la racine hébergent toutes la même population bactérienne, ou si, au niveau de l'organe, on retrouve une répartition inégale. Nous avons pensé pouvoir compléter ces résultats par des observations cytologiques.

III - Recherches cytologiques :

Nous utilisons la technique de Milovidov () que l'auteur a mise au point pour différencier les bactéries des nombreux éléments figurés de la cellule.

A. Techniques :

• Fixation :

séjour à l'obscurité dans le mélange
fixateur suivant :

- acide chromique à 1% 50 parties
- bichromate de potassium à 1% 50 "
- formol neutre 8 "

La durée de la fixation est de 48 heures. Le mélange est renouvelé après 24 heures en raison de son oxydation.

• Lavage :

Le lavage est une opération importante; s'il est insuffisant, les tissus se colorent mal et les coupes se conservent difficilement. Sa durée doit être au moins égale à celle de la fixation. Les pièces sont lavées à l'eau courante.

• Inclusion à la paraffine :

Elle est conduite de façon classique : déshydratation par passages successifs dans la série des alcools, imprégnation par le xylène et bains de paraffine.

• Coupes :

Elles sont effectuées au microtome, à l'épaisseur de 7,5 microns. Les tiges et les racines sont coupées le plus souvent transversalement.

• Coloration :

Nous rappelons la méthode de Milovidov et indiquons les temps de coloration qui nous ont semblé être les meilleurs pour notre matériel.

- coloration à la rubine acide à 5%, sur la platine chauffante, pendant 5mn après l'apparition des premières vapeurs.
- Lavage à l'eau.
- Différenciation à l'aurantia à 0,5% dans l'alcool à 70° pendant 10mn au maximum.
- Lavage à l'eau.
- Traitement par le mélange suivant :

acide phosphomolybdique	1g
soude caustique normale	10cc
eau distillée	90cc.

 pendant 3 minutes.
- Lavage à l'eau.
- Coloration pendant 15 minutes par le Bleu de Unna de composition suivante :

bleu de Unna	1/3
glycérine	1/3
eau distillée	1/3.

- Lavage à l'eau.
- Différenciation au tanin orange de Unna, pendant 2 minutes au maximum.
- Lavage à l'eau.

Dans ces conditions, la chromatine est colorée en vert, les nucléoles en rouge, les bactéries en bleu violacé plus ou moins sombre.

Nous montons au Xam.

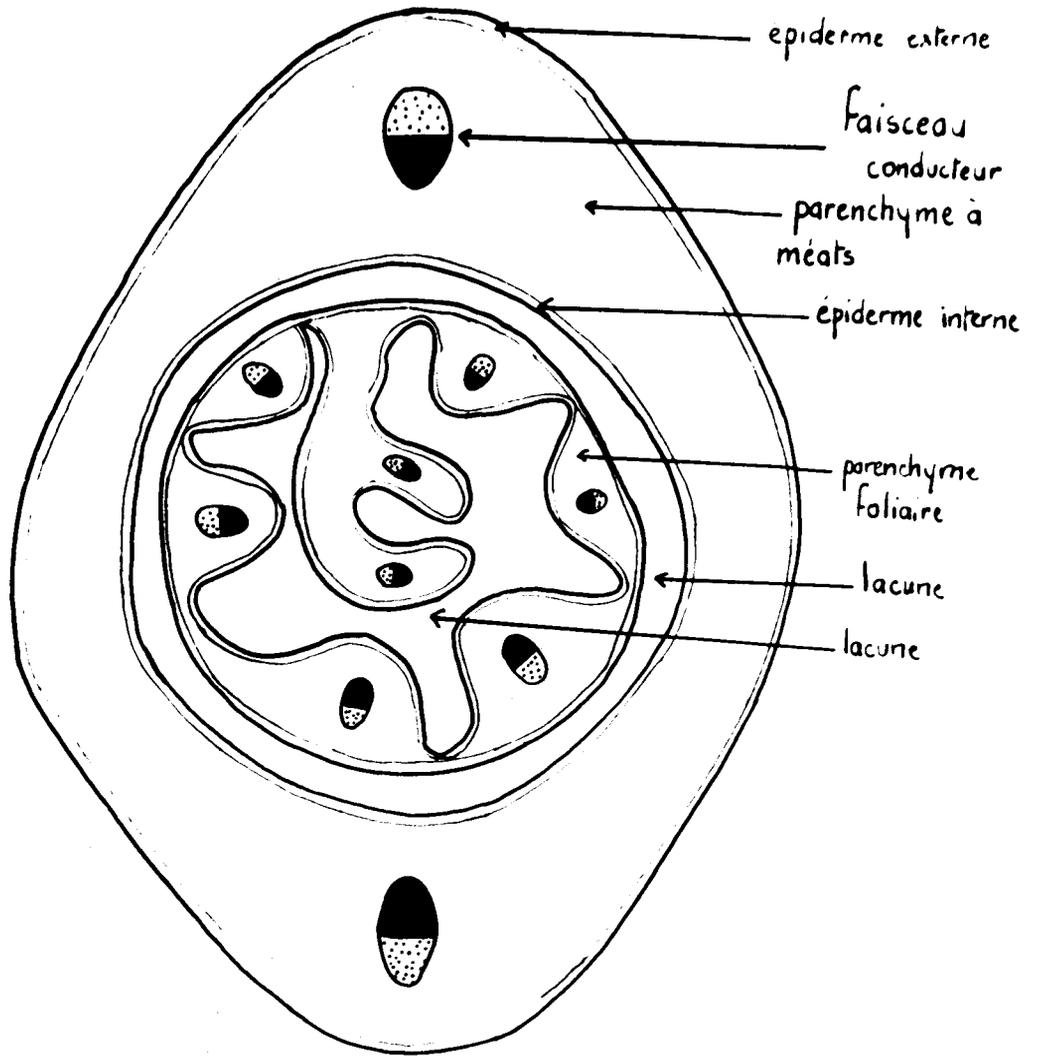
B. Résultats :

I. Etude anatomique du matériel :

a) Tige :

La coupe montre nettement deux parties circulaires concentriques (p. 26 bis).

La zone centrale, constituée par la jeune feuille enroulée sur elle-même, est formée de cellules généralement petites et rondes. Les noyaux assez volumineux y ont pris la coloration verte, tandis que les parois cellulaires ont retenu le rouge. Un épiderme simple borde la face interne et externe de l'organe. Les réserves incluses dans les cellules sont importantes. Le centre de la coupe est occupé par une lacune plus ou moins importante, selon le niveau où la



SCHEMA DE LA COUPE DE JEUNE TIGE

coupe est pratiquée. On observe enfin de nombreux faisceaux libéro-ligneux.

La zone périphérique, ou coléoptile, contraste avec la précédente par la taille importante de ses cellules; celles-ci, ont une forme rectangulaire; elles ne contiennent pas de réserve : leur noyau est de faible volume. Cet organe ne montre que deux faisceaux libéro-ligneux, en position diamétralement opposée l'un par rapport à l'autre.

b) Racine.

La racine jeune a un diamètre très faible (1 à 2 millimètres). Sa structure anatomique (p.) est classique : cylindre central réduit, parenchyme cortical assez important. Les cellules sont petites et ronds. Leur cytoplasme est riche en réserve, mais en quantité moindre que dans la tige. Les noyaux, assez volumineux, sont colorés en vert, et renferment quelques nucléoles rouges.

2. Recherche des bactéries :

Après ce bref rappel de la structure anatomique des jeunes tiges et racines de blé, nous abordons le but essentiel de notre travail : l'étude

précise des micro-organismes, qu'elles hébergent.

a) Racine :

Au cours de nombreux examens, nous avons observé, assez rarement toutefois, quelques cellules qui hébergent des bactéries. Celles-ci se présentent sous forme de cocci ou de bâtonnets très courts, à l'intérieur des cellules. Elles ont une couleur bleu-violacé plus ou moins sombre. Souvent, elles sont entourées d'une zone faiblement colorée, floue : certainement une substance mucilagineuse. Ces colonies sont constituées d'un nombre variable de bactéries (on peut en compter jusqu'à 15).

(Pl. I - p. 43).

Pour vérifier que nous nous adressions bien à des micro-organismes existant dans les tissus de la racine, nous avons fait quelques contrôles d'observation : les bactéries apparaissent nettement toujours dans le plan de la cellule : ainsi, en variant la mise au point de notre microscope, elles disparaissent en même temps que les autres éléments figurés de la cellule. D'autre part, nous recherchons sur des coupes voisines, dans les cellules correspondantes, les micro-organismes.

observés sur l'une d'elles : ce test a été fait plusieurs fois avec succès. Ces moyens de contrôle nous confirment qu'il s'agit bien de bactéries intracellulaires.

Les bactéries se localisent-elles dans une zone particulière du plan horizontal ? Malgré des observations systématiques d'un grand nombre de coupes, il ne nous a pas été possible de déceler un tissu plus riche en cellules-hôtes qu'un autre : nous avons localisé des bactéries aussi bien dans le centre que dans la périphérie de la racine.

Une préoccupation identique, mais cette fois dans le sens vertical, n'a pas permis non plus la mise en évidence d'un étage de la racine plus riche en micro-organismes qu'un autre. De toutes façons, le nombre de bactéries décelées dans les racines, celles-ci n'ayant subi aucun traitement préalable, est très faible.

Nous avons remarqué toutefois une augmentation du nombre des cellules hôtes lorsque nous faisons des coupes à des niveaux se rapprochant de plus en plus du grain. Cette constatation

peut sembler intéressante si on cherche à relier la présence des bactéries à la physiologie de la plante qui les héberge.

En conclusion, cette étude cytologique nous confirme la présence, en nombre restreint, de micro-organismes dans les tissus de la racine.

b) Tige :

La recherche des bactéries sur des coupes transversales de jeunes tiges de blé en cours de germination s'est avérée plus facile que dans les racines. Les cellules hôtes y sont en effet plus nombreuses, à certaines périodes de la germination tout au moins.

Les colonies offrent le même aspect que celles de la racine. Elles sont formées de cocci ou de courts bâtonnets; elles ont pris, là encore, une coloration bleu-violacé caractéristique. Elles se montrent, ici encore, groupées en associations plus ou moins importantes. Après avoir fait les mêmes contrôles d'examen que pour l'observation de la racine, nous concluons qu'elles se tiennent bien à l'intérieur des cellules du tissu. Nous avons

pu en observer un grand nombre, sur des coupes provenant de 20 germinations environ. Nous retrouvons donc ici encore un résultat obtenu par les méthodes de bactériologie : la tige est plus riche en micro-organismes que la racine.

Dans le domaine de la localisation, nous pensons avoir réalisé des observations intéressantes. En effet, les cellules hôtes d'une coupe se localisent surtout à la périphérie de l'organe, et plus précisément dans la section de la gaine de la tige. Cette zone riche en bactéries correspond au parenchyme du coléoptile; elle a été décrite ci-dessus. Nous y avons vu des colonies dans les couches cellulaires situées juste sous l'épiderme externe (Pl. II - p. 44). Les cellules plus internes peuvent néanmoins en héberger : (Pl. III P. 45).

Cette localisation n'est cependant pas exclusive : on trouve parfois également des bactéries dans la section de la tige proprement dite; là encore, elles se trouvent dans des cellules du parenchyme. (Pl. iv. p. 46.)

D'autre part, nous avons recherché pour les tiges, si les micro-organismes se trouvaient groupés à un étage plus qu'à un autre dans le coléoptile. Les coupes étant toutes numérotées, il nous a été facile de constater que celles qui montrent les cellules hôtes les plus nombreuses sont toujours proches les unes des autres sur les lames.

Cette observation nous incite donc à penser qu'il existerait une zone du coléoptile qui hébergerait un nombre maximum de bactéries. La localisation précise de cette région n'a cependant pu être facile.

Nous avons remarqué que, si nous nous adressons à des tiges de deux centimètres de haut environ, nous observons un nombre important de cellules-hôtes. A ce stade, le coléoptile est bien développé et la feuille ne l'a pas encore percé. Ce résultat d'ailleurs confirme celui que nous avons obtenu par la technique de bactériologie.

Ces différents examens aboutissent tous à une même constatation : le coléoptile tient une place importante dans l'hébergement des

micro-organismes. Il serait sans doute intéressant de chercher si l'on peut trouver une corrélation dans l'ordre physiologique à cette constatation cytologique.

3. Conclusions :

Les observations cytologiques que nous venons de décrire montrent que les tissus d'un caryopse de blé en germination hébergent normalement des micro-organismes; cependant la tige et principalement le coléoptile qui la protège ont une place importante dans la répartition de ces bactéries. Ces résultats, confirmant les conclusions obtenues dans la première partie de notre travail, ont été atteints ici encore par une technique rigoureusement aseptique. Ils posent donc le problème de l'origine de ces bactéries.

Nous avons vu qu'il s'en trouvait dans le grain proprement dit, avant la germination. Nous en retrouvons dans la tige et la racine, après un développement stérile : elles tirent donc leur origine du grain. En ce cas, au cours de la germination, la population bactérienne migre du grain vers les jeunes organes en croissance. Quelle voie emprunte-t-elle ?

IV - Germination en atmosphère d'azote :

Les observations faites par la cytologie ont montré que les micro-organismes hébergés dans les tissus sains de plantule de blé n'existent jamais en nombre très important dans les cellules-hôtes. En vue d'une étude plus précise, nous avons cherché à provoquer la multiplication des bactéries présentes dans les cellules étudiées. Nous avons donc eu recours à une méthode déjà utilisée dans le cadre de travaux antérieurs qui portaient sur l'étude d'explantats prélevés sur la pomme de terre, la carotte et la betterave. Cette méthode est fondée sur l'influence de l'azote gazeux sur les bactéries. Nous l'avons appliquée aux plantules entières (non plus à un fragment d'organe) en cours du développement.

A. Technique :

I. Technique de germination :

Nous stérilisons des tubes à essais dans lesquels nous avons préalablement introduit un tampon de coton imbibé d'eau. Un grain stérilisé comme précédemment est introduit dans chaque tube: cette manipulation est faite en chambre stérile, au-dessus de la flamme, dans des conditions rigoureuses d'asepsie.

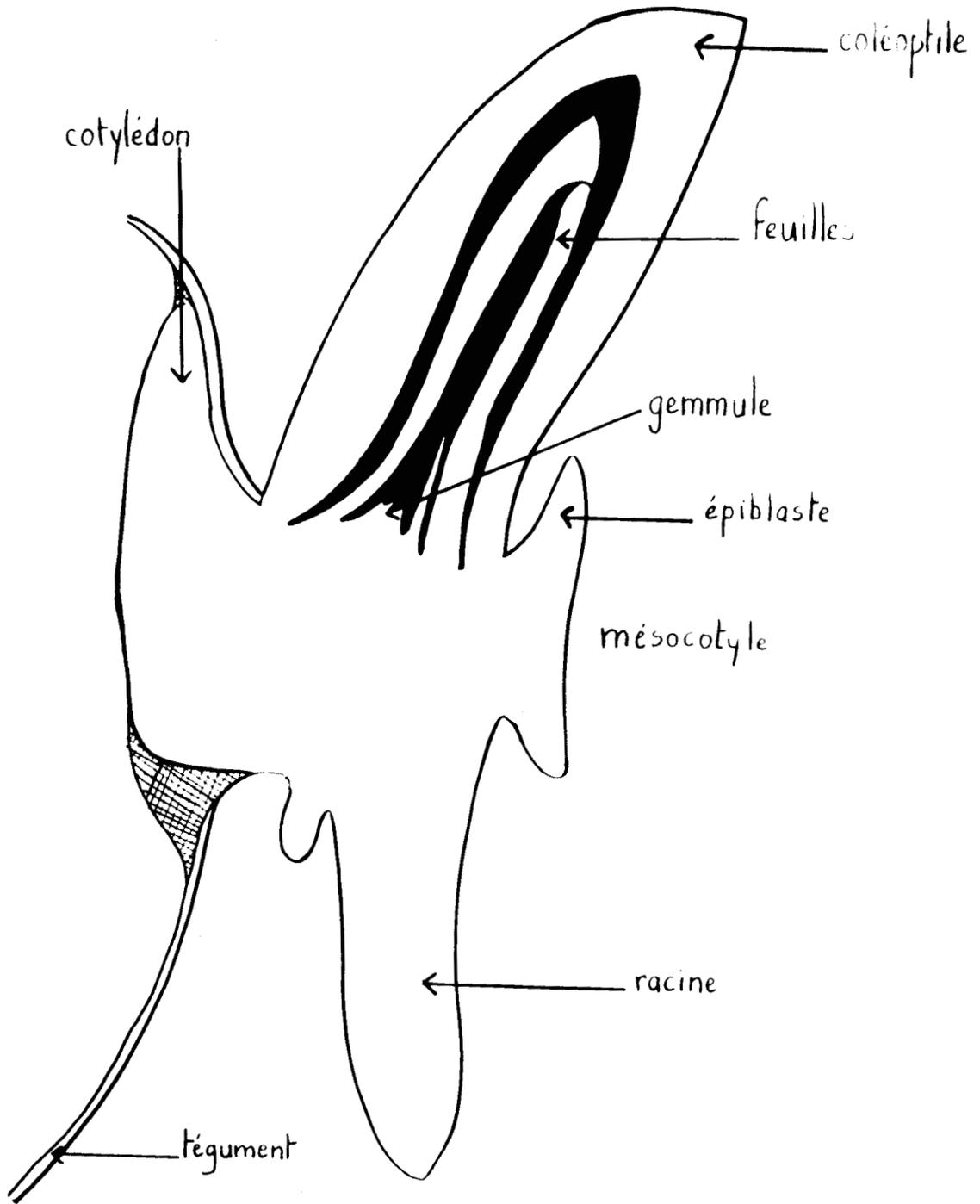
2. Mise en atmosphère azotée :

Lorsque les grains ont gonflé, les tubes qui les contiennent sont soumis, dans un dessiccateur, à un faible courant continu d'azote R. Ce traitement se prolonge jusqu'à l'apparition de la plantule. Dès que celle-ci a atteint 2 à 3 millimètres environ, le grain est retiré et soumis aux techniques cytologiques (fixation, inclusion, coloration) identiques à celles que nous avons décrites plus haut.

B. Résultats.

Nous avons fait des coupes longitudinales perpendiculaires à l'axe du grain. Les plantules apparaissent comme sur le schéma (p.35^{bis}).

L'observation de ces coupes montre que les micro-organismes se sont abondamment multipliés à l'intérieur des cellules qui les hébergeaient : il est impossible de les compter dans certaines cellules qui en sont littéralement remplies. Ce développement spectaculaire des bactéries ne peut être attribué qu'à l'influence de l'azote : il a été observé, moins intensément cependant que dans les travaux précédents. (10.). Les bactéries, examinées dans les cellules-hôtes du blé, sont des cocci ou des bacilles de couleur violette plus ou moins



SCHEMA DU COLEOPTILE

ET DES ORGANES VOISINS

sombre. Elles sont agglutinées dans une substance d'aspect mucilagineux et transparent. Elles se groupent dans les cellules : parfois, elles entourent le noyau, parfois elles sont au contraire placées contre les parois cellulaires. Souvent, nous avons pu remarquer que les cellules-hôtes formaient des files dans les tissus.

Retrouvons-nous, sur le plan de la répartition des micro-organismes, les résultats que nous avons obtenus précédemment ? Pour répondre à cette question, nous avons étudié deux stades différents de germination sous azote (coléoptile inférieur ou supérieur à 3 millimètres).

Les micro-organismes, au début du développement du grain, sont très nettement groupés dans la partie basale du coléoptile. Les cellules-hôtes, qui ont vu leurs bactéries se multiplier activement, y forment de véritables plages. Les micro-organismes semblent se localiser dans la région axiale de la zone d'insertion du coléoptile; sur certaines coupes observées, dans les plantules très jeunes, seules 4 ou 5 cellules hébergent des bactéries; elles sont toujours dans cette zone.

A un stade plus avancé (coléoptile 5mm), nous observons la même influence de l'azote gazeux sur la population bactérienne au sein des tissus. Une

différence cependant s'impose : la répartition des micro-organismes est différente : il nous est possible, en effet, d'en observer jusqu'à l'extrémité apicale du coléoptile.

V - Conclusions générales.

I) Comme l'avait déjà établi un travail précédent (5) les grains de blé hébergent des bactéries.

A la liste des trois espèces déjà rencontrées (Bacillus cereus, Bacillus licheniformis, Bacillus coagulans) nous avons ajouté : Bacillus pumilus, Bacillus cereus var. mycoïdes, Sarcina.

2) Nous avons étudié la fréquence comparée des différentes souches isolées et avons constaté que Bacillus cereus est nettement dominant.

3) Nous avons établi, tant par les méthodes bactériologiques que par les observations cytologiques, que les micro-organismes présents dans le grain se retrouvent dans les racines et les tiges des jeunes plantules.

4) Les bactéries semblent être moins nombreuses dans les racines que dans les tiges. Dans ce dernier organe elles paraissent plus fréquentes dans les tissus du coléoptile.

5) Le séjour des jeunes plantules, dans des conditions stériles, sous atmosphère d'azote, provoque la multiplication importante du nombre des

micro-organismes.

- 6) De l'ensemble de ces résultats, nous pouvons conclure que les bactéries initialement hébergées par le grain, migrent, au cours de la germination dans la jeune plantule.

Références Bibliographiques.

- 1) - MILOVIDOV P.F. - 1928. Bull. Hist. Appli. 5.
p. 382-391.
- 2) - PILET, P.E. - Les Phytohormones de croissance.
Masson. 1961.
- 3) - MONTUELLE, B. - Présence de bactéries dans les tubercules de pomme de terre.
Bull. Soc. Bot. du Nord de la France
1959. 12. N°4. 140-4.
- 4) - GAUTHERET, J. - La culture des tissus végétaux.
Masson. 1959.
- 5) - LAPERE, G. - Isolement, caractères et détermination des bactéries vivant dans les organes végétaux.
D.E.S. Lille. Janvier 1963.
- 6) - BLONDEAU, R. - Contribution à l'étude des bactéries présentes dans les tubercules sains de pommes de terre.
D.E.S. Lille. Mai 1963.
- 7) - LAMBIN, S. & GERMAN, A : Précis de microbiologie.
Masson. Paris. 1961.

- 8) - BERGEY : Manual of determinative bacteriology.
7ème édition. Williams & Wilkins Com-
pany - 1957. Baltimore.
- 9) - PREVOT, R. - Traité de systématique bactérienne.
1961. Dunod. Paris.
- 10) - HIVET, M. - Recherches cytologiques de bactéries
dans les racines de betteraves saines.
D.E.S. Lille. 1962.

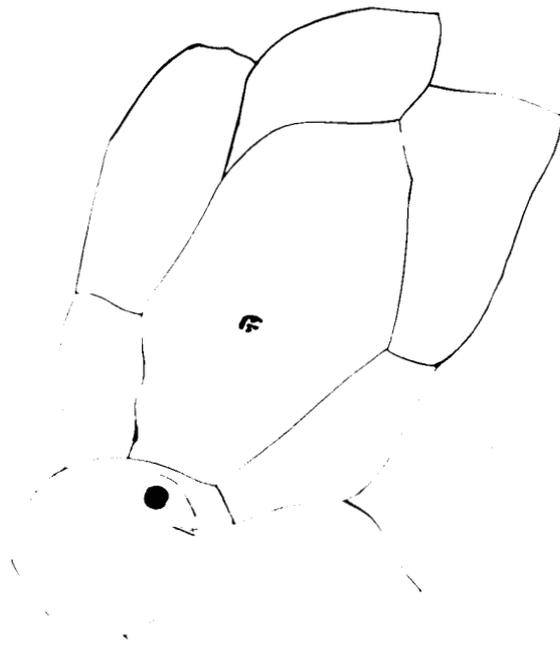
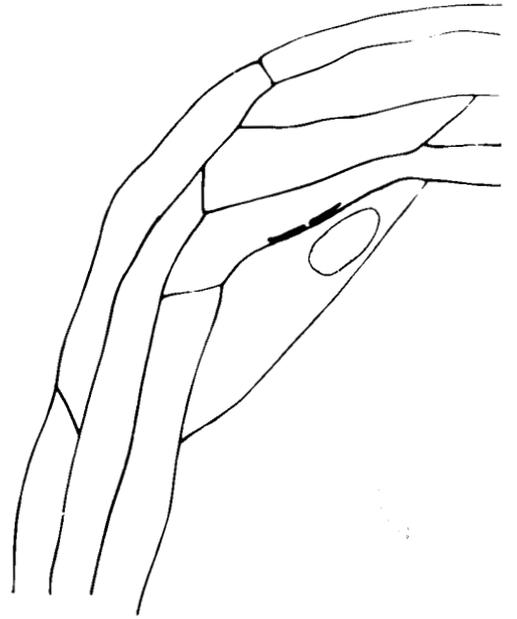
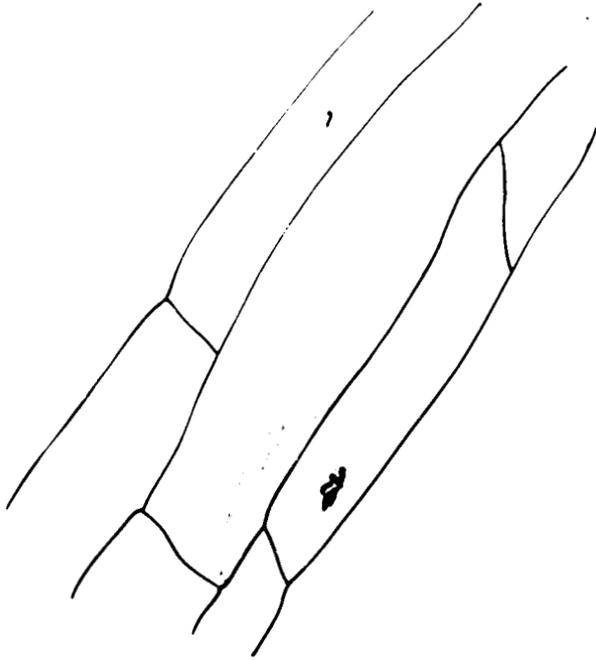
-:-:-:-:-:-:-:-

Table des Matières.

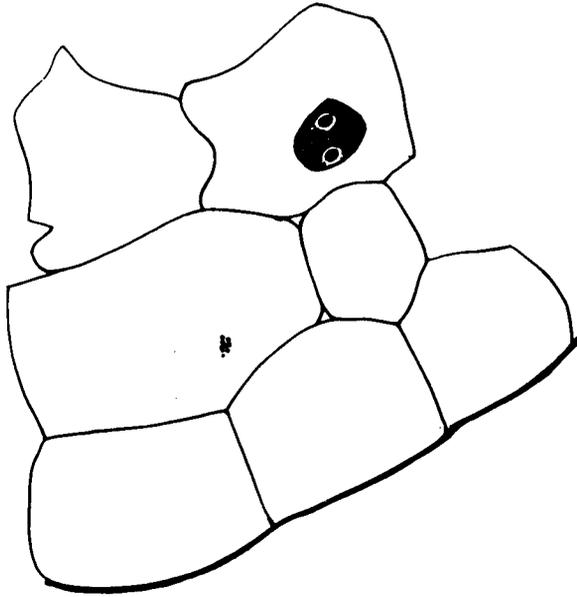
	Pages
Introduction	0
I - Recherche d'une technique de germination stérile	2
A - Stérilisation des grains de blé ...	2
B - Pouvoir germinatif après stérilisation.....	4
C - Choix de la technique.....	7
D - Milieu de germination	7
E - Conclusion	9
II - Recherches bactériologiques au cours de la germination	9
A - Isolement et culture des souches ..	10
B - Détermination des bactéries isolées	14
C - Résultats et conclusion de l'étude bactériologique	20
III - Recherches cytologiques	23
A - Techniques	23
B - Résultats	23
IV - Germination en atmosphère d'azote	34
A - Techniques	34
B - Résultats	34
V - Conclusions générales	38
Références bibliographiques	40

PL. 1

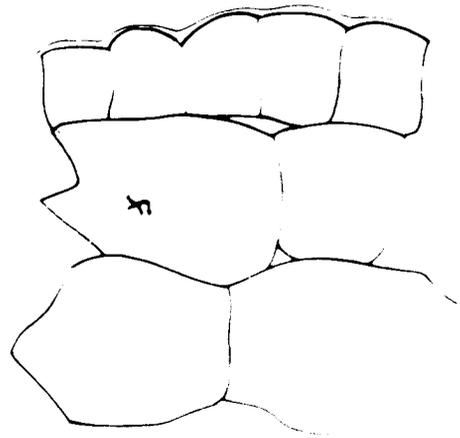
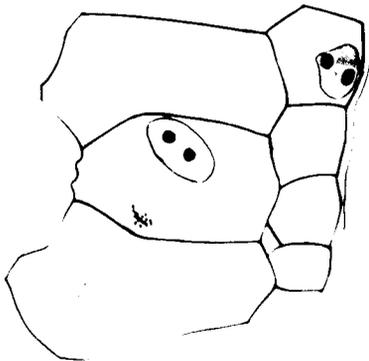
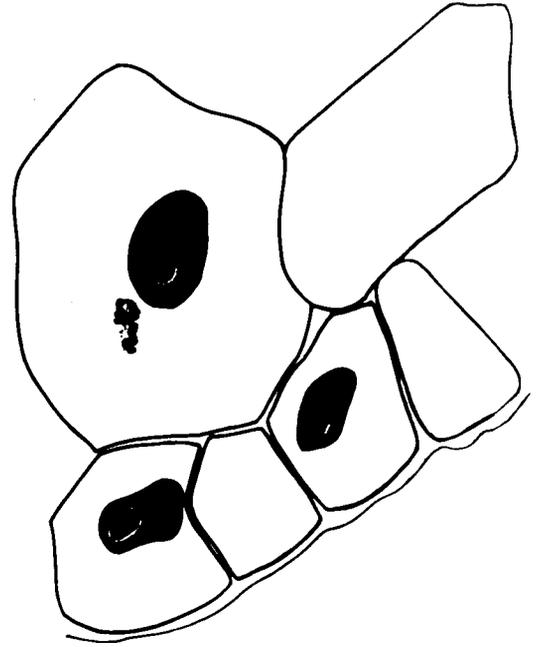
Racine



PL.2

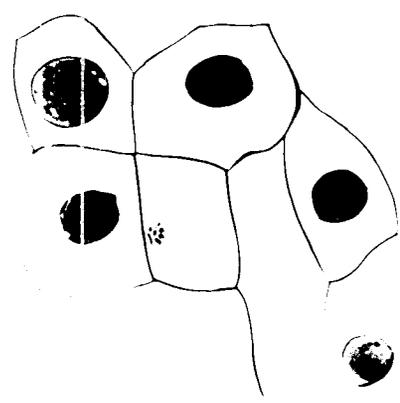
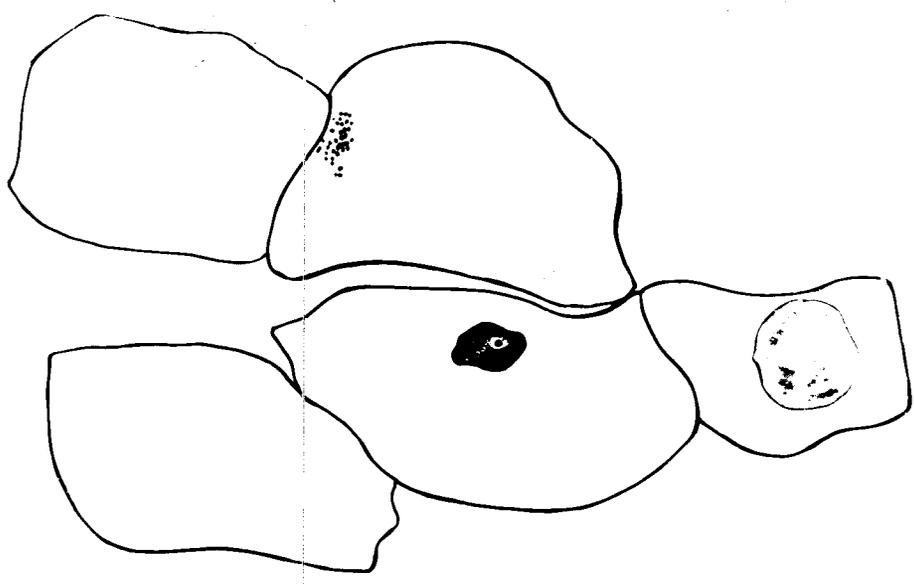


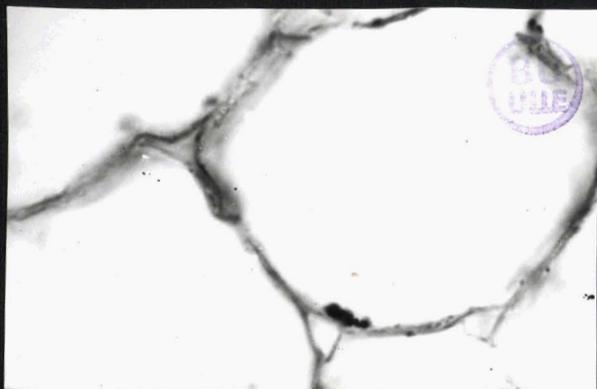
Coléoptile



PL.4

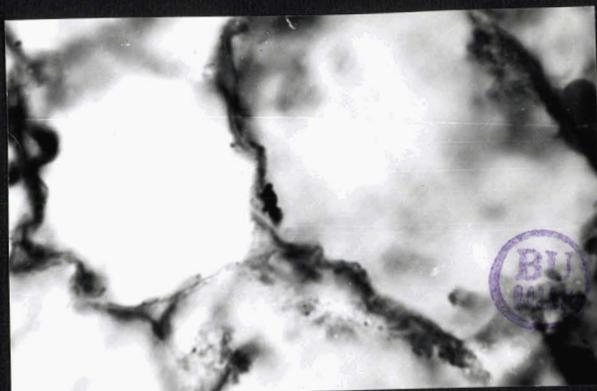
Tige





Colonie bactérienne adhérant
à la paroi cellulaire.paren-
chyme du coléoptile.(coupe
transv.) G=1.800

Colonie bactérienne adhérant
à la paroi cellulaire.paren-
chyme de la tige.(coupe
transv.) G=1.800

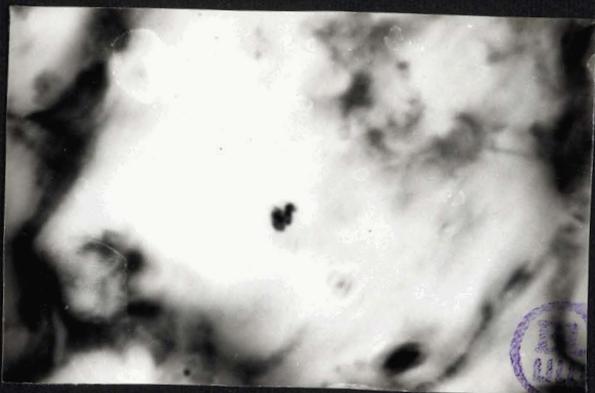


Cellule parenchymateuse du co-
léoptile,hébergeant une colonie
bactérienne.(coupe transv.)
G = 1.800



Colonie bactérienne entourée
de mucilage, dans le parenchyme
du coléoptile. (coupe transv.)
G=I.800

Cellule parenchymateuse du co-
léoptile, hébergeant une colonie
bactérienne. ((coupe transv.)
G=I.800



Cellule parenchymateuse de
plantule de blé, après action
de l'azote. (coupe long.) BU
LILLE
G=1.800