

Bernard MONTUELLE

Maître-assistant

LES BACTÉRIES HÉBERGÉES PAR LES PLANTES SUPÉRIEURES.

LEUR LOCALISATION, LEUR MÉTABOLISME

ET SES RAPPORTS AVEC CELUI DE LA PLANTE HÔTE

FACULTÉ DES SCIENCES DE LILLE

Docteurs Honoraires : MM. LEFEBVRE, PRUVOST.

Professeurs Honoraires : MM. ARNOULT, BEGHIN, CAU, CHAPELON, CHAUDRON, CORDONNIER, DEHEUVELS, DEHORNE, DOLLE, FLEURY, P. GERMAIN, KOURGANOFF, LAMOTTE, LELONG, M^{me} LELONG, MM. MAZET, A. MICHEL, NORMANT, PARISELLE, PASCAL, PAUTHENIER, ROIG, ROUBINE, WIEMANN, ZAMANSKY, ROSEAU.

Doyen : M. TILLIEU, Professeur de Physique.

Assesseurs : M. DURCHON, Professeur de Zoologie
M. HEUBEL, Professeur de Chimie Minérale.

Professeurs : MM. BACCHUS, Astronomie, Calcul numérique.

BECART, Physique.
BERKER, Mécanique des Fluides.
BONNEMAN-BEMIA, Chimie et Physico-Chimie Industrielles.
BONTE, Géologie appliquée.
BOUISSET, Physiologie animale.
BOURIQUET, Botanique.
CELET, Géologie.
CORSIN, Paléobotanique.
DECUYPER, Mathématiques.
DEDECKER, Professeur associé, Math.
DEFRETIN, Biologie marine, Zoologie.
DEHORS, Physique Industrielle.
DELATRE, Géologie.
DELEAU, Géologie.
DESCOMBES, Calcul différentiel et intégral.
GABILLARD, Radioélectricité et Électronique.
GERMAIN, Chimie Générale et Chimie organique.
GLACET, Chimie.
GONTIER, Mécanique des Fluides.
Heim de BALSAC, Zoologie.
HOCQUETTE, Botanique Générale et Appliquée.
LEBEGUE, Botanique.
LEBRUN, Radioélectricité et Électronique.
M^{lle} LENOBLE, Physique.
MM. LEBBAERT, Radioélectricité.
LINDER, Botanique.
LUCQUIN, Chimie minérale.
MARION, Chimie.
M^{lle} MARQUET, Mathématiques.
MM. MARTINOT-LAGARDE, Mécanique des Fluides.
MAUREL, Chimie.
MENESSION, Géologie.
MONTREUIL, Chimie Biologique.
PARREAU, Mathématiques.
PEREZ, Physique Expérimentale.
PHAM MAU QUAN, Mécanique rationnelle et expérimentale.
POITOU, Algèbre supérieure, calcul numérique.
PROUVOST, Géologie.
ROUELLE, Physique et Électricité Industrielle.
SAVARD, Chimie générale.
SCHALLER, Zoologie.
SCHILTZ, Physique.
M^{me} SCHWARTZ, Analyse supérieure.
MM. TRIDOT, Chimie.
VIVIER, Biologie animale.
WATERLOT, Géologie et Minéralogie.
WERTHEIMER, Physique.

Maîtres

de Conférences : MM. ANDRÉ, Zoologie.
BEAUFILS, Chimie appliquée.
BLANCHARD, Chimie Appliquée.
BLOCH, Psychophysiologie.
BOILLET, Physique.
BUI TRONG LIEU, Mathématiques.
CONSTANT, Physique.
COMBET, Mathématiques.
DANZÉ, Géologie.
DELHAYE, Chimie.
FOURET, Physique.
FOATA, Mathématiques.
GAVORET, Physique Théorique.
HERZ, Mathématiques.
HUARD de la MARRE, Calcul numérique.
LACOMBE, Mathématiques.
M^{me} LEBEGUE, Physique.
MM. MAES, Physique.
MONTARJOL, Chimie.
MOUVIER, Chimie.
MORIAMEZ, Physique.
NGUYEN PHONG CHAU, Physique.
POUZET, Mathématiques.
RAUZY, Mathématiques.
VAZARD, Botanique.

Conseiller d'administration : M. JARRY.

Attaché Principal : M. FACON.

Attachés d'Administration : MM. COLLIGNON, LEROY.

N° d'ordre 129

55376
1965
11



55376
1965
11

THÈSES

présentées

à la Faculté des Sciences de l'Université de Lille

pour obtenir le grade de

Docteur ès Sciences Naturelles

par

Bernard MONTUELLE

Maitre-assistant

1^{re} THÈSE

Les bactéries hébergées par les plantes supérieures.

**Leur localisation, leur métabolisme
et ses rapports avec celui de la plante hôte.**

2^e THÈSE

Propositions données par la Faculté

Soutenues le 7 Mai 1965 devant la Commission d'examen :

MM. M. HOCQUETTE, Président
R. DEFRETIN, Examineur
Ch. DELATTRE, Examineur
R.J. GAUTHERET, Invité
Ch. GERNEZ-RIEUX, Invité

Imprimerie MOREL et CORDUANT
11, rue des Bouchers — LILLE

1965



A LA MÉMOIRE DE MON PÈRE

A MA MÈRE,

en témoignage d'affection

A MA FEMME,

en souvenir de nos études

A MES ENFANTS

A MA FAMILLE

Avant-propos

Ce n'est pas seulement une tradition universitaire mais un devoir et plus encore un grand plaisir pour moi de rendre tout d'abord hommage à M. le Professeur HOCQUETTE, Directeur de l'Institut de Botanique de la Faculté des sciences de Lille. Patiemment il n'a cessé, au cours de mes études puis de ma carrière, à Grenoble comme à Lille, de m'entourer de sa bienveillante et amicale attention. Constamment animé du souci de respecter tant qu'il se pouvait mes tendances et ma personnalité, il a su, à tous les stades de ce travail, me faire profiter de ses grandes connaissances et de ses conseils précieux. Il préside aujourd'hui ce jury ; je sais combien il désirait et attendait cet instant. Je le remercie pour la confiance si souvent témoignée et je le prie de bien vouloir accepter, ainsi que M^{me} HOCQUETTE, l'expression de ma très vive et très profonde reconnaissance.

Le respect que je porte à M. DEFRETIN, Professeur à la Faculté des Sciences et Directeur de l'Institut de biologie maritime et régionale de Wimereux, date de l'époque où je suivais son enseignement à l'Institut de Zoologie. Les contacts que j'ai eus depuis avec lui ont toujours été excellents ; malgré ses nombreuses occupations, il participe à ce jury ; je tiens à lui exprimer toute ma gratitude.

J'adresse également mes remerciements à M. DELATTRE, Professeur à la Faculté des Sciences. Il s'est très cordialement intéressé à mon travail ; il a bien voulu examiner mes résultats et juger ce mémoire.

Je tiens pour un très grand honneur que Messieurs les Professeurs GAUTHERET et GERNEZ-RIEUX aient bien voulu, malgré le poids de leurs multiples tâches, venir à Lille pour participer à la soutenance de mon travail.

A M. GAUTHERET, Professeur à la Sorbonne, Membre de l'Institut, je voudrais dire combien j'ai été touché par le bienveillant intérêt qu'il m'a toujours témoigné. Ses conseils et ses encouragements m'ont été d'un grand réconfort pour persévérer. Puis-je ne pas le décevoir ! Je le prie de bien vouloir agréer l'expression de ma très profonde et très respectueuse reconnaissance.

M. le Professeur GERNEZ-RIEUX, Directeur des Instituts Pasteur de Paris et de Lille, Membre de l'Académie de Médecine, m'a très généreusement fait profiter de l'organisation remarquable des laboratoires de l'Institut Pasteur de Lille et de la grande valeur scientifique de ses services. Je voudrais lui exprimer ici toute ma déférente gratitude pour son aide et sa présence à ce jury.

Ma reconnaissance va également à M. BEERENS, Chef de service à l'Institut Pasteur de Lille. Il m'a toujours aimablement reçu et écouté, il m'a initié aux méthodes bactériologiques, a vérifié mes déterminations, suggéré certaines expériences et a bien voulu relire une partie importante de ce mémoire. Je lui dois beaucoup et le prie d'accepter mes remerciements très cordiaux.

Il m'est agréable d'évoquer également les amicales et fructueuses conversations que j'ai eues au sujet de mes recherches avec M. le Professeur BOURIQUET.

A tous mes collègues et amis du Laboratoire j'exprime ma cordiale sympathie.

Je remercie encore le Conservateur et le Personnel de la Bibliothèque universitaire de Lille et le Centre de documentation du C.N.R.S. qui m'ont beaucoup aidé pour les recherches bibliographiques.

La Fédération des Producteurs de plants de pomme de terre m'a apporté un appui précieux dont je lui suis très reconnaissant.

Ma femme enfin a accepté avec tant de patience que je prenne de nombreuses heures de travail sur le temps de la famille, elle m'a efficacement aidé dans la révision du manuscrit ; je la remercie très affectueusement.

Introduction

« Souvent dans nos causeries du laboratoire, depuis bien des années, « j'ai parlé aux jeunes savants qui m'entouraient de l'intérêt qu'il y « aurait à nourrir un jeune animal dès sa naissance avec des matières « nutritives pures. Par cette dernière expression, j'entends désigner « des produits alimentaires qu'on priverait artificiellement et complè- « tement des microbes communs.

« Sans vouloir rien affirmer, je ne cache pas que j'entreprendrais « cette étude, si j'en avais le temps avec la pensée préconçue que la vie « dans ces conditions deviendrait impossible...

« ...Que le résultat soit positif et confirme la vue préconçue que « je mets en avant ou qu'il soit négatif et même en sens inverse, c'est- « à-dire que la vie soit plus facile et plus active, il y aurait un grand « intérêt à tenter l'expérience ».

Ainsi s'exprimait PASTEUR en 1885 devant l'Académie des Sciences alors qu'il venait d'y présenter une note de DUCLAUX.

Par ces propos, celui qui achevait de détruire définitivement l'hypothèse de la génération spontanée, signalait aux chercheurs tout l'intérêt qu'il voyait dans l'étude des relations entre des organismes appartenant à des embranchements, voire à des règnes différents.

Certes ce domaine est très vaste : il existe en particulier une variabilité très grande dans les modalités de ces relations. En partant d'un simple voisinage on s'achemine en effet, par étapes successives vers la pénétration, indispensable à la survie, d'une espèce dans une autre. Pour les virus par exemple, mais il s'agit là d'un cas extrême, la simplification physiologique va obligatoirement de pair avec la dépendance stricte d'un autre être vivant indispensable à sa reproduction. Les associés peuvent être d'ailleurs, et ceci élargit encore le problème, très proches ou très éloignés l'un de l'autre, dans la classification.

Enfin, ces rapports entre catégories d'êtres différents ne sauraient, à l'échelle du temps, être considérés comme immuables. Les exemples précis que nous connaissons, ne représentent vraisemblablement que des états d'équilibre instable et précaire. Si certaines associations nous paraissent établies au point de revêtir un caractère d'impérieuse obligation on peut cependant considérer qu'elles résultent d'un cheminement progressif lentement réalisé et qu'elles sont susceptibles d'une dissociation graduelle de laquelle bien entendu chacun des organismes sortira modifié.

Les observations et suggestions de PASTEUR que nous évoquions plus haut, furent écoutées et les travaux entrepris. S'il est certain que chez la plupart des animaux la flore ou la faune intestinale contribue à la transformation des aliments, la possibilité de la vie aseptique est de nos jours parfaitement établie. Elle a été réalisée dans le règne animal notamment par NUTTALL et THIERFELDER (1895), COHENDY (1912) pour des mammifères ; METCHNIKOFF (1901) pour des têtards de grenouille ; WOLLMAN (1911) et GUYENOT (1917) pour des mouches (*Calliphora* et *Drosophilla*).

Les végétaux présentent eux aussi de nombreux exemples de types variables d'association entre espèces différentes : nous étudierons essentiellement, au cours de ce travail, les relations qui existent entre les végétaux supérieurs et les bactéries.

Les connaissances classiques et actuelles en ce domaine peuvent se ranger sous trois rubriques différentes :

1^o Les végétaux supérieurs et les bactéries sont en voisinage, en contact dans le sol : les seconds réalisant extérieurement aux premiers et à leur profit un grand nombre de modifications chimiques sans lesquelles les plantes ne pourraient continuer à se développer. Ce domaine est celui de la microbiologie du sol, science relativement jeune dont les acquisitions sont importantes et l'avenir prometteur.

2^o Des bactéries déterminées peuvent, dans certaines conditions pénétrer dans les cellules végétales et provoquer la maladie. Celle-ci se manifeste par des modifications morphologiques (tumeurs, nécroses, déformations) ou physiologiques qu'étudie la phytopathologie.

3^o Enfin, dans certains cas précis, la pénétration des micro-organismes dans la plante n'aboutit pas à la maladie mais conduit, au contraire, à un profit réciproque appelé *symbiose*. C'est le cas bien connu des Légumineuses et de quelques autres plantes.

Les travaux que nous avons entrepris et qui font l'objet de ce mémoire ne peuvent se ranger dans aucune de ces trois catégories. Nous avons, en effet, rejoignant un certain nombre d'auteurs d'ailleurs peu nombreux, établi, en faisant appel à des méthodes éprouvées, que les cellules d'un certain nombre de végétaux sains pouvaient héberger des bactéries.

Il ne s'agit pas de microbiologie du sol puisque, pour isoler les micro-organismes, nous partons de tissus végétaux ; sans doute nos recherches ont-elles des rapports avec cette discipline, ne serait-ce que sur le plan de l'origine des bactéries.

La phytopathologie reste aussi en dehors du domaine de nos travaux puisque les organes végétaux utilisés ne présentent aucun symptôme pathologique connu. Mais les limites de la maladie sont-elles si facilement définissables ? Les connaissances actuelles ne permettent pas d'envisager l'existence d'états intermédiaires entre la maladie d'une part c'est-à-dire l'agression, le profit exclusif, et la symbiose d'autre part. Il pourrait cependant exister un passage progressif entre ces deux formes d'interrelations.

Enfin, nous ne pouvons ranger les végétaux que nous avons étudiés à côté des Légumineuses : les bactéries isolées ne sont pas des *Rhizobium*, elles sont loin d'être aussi nombreuses que dans les nodosités, leur présence

n'est pas réservée à certaines cellules spécialisées, au contraire elles semblent avoir une répartition très diffuse. D'un autre côté, nous le verrons, aucun indice physiologique net ne nous permet, pour l'instant, de parler de symbiose typique.

Force nous est donc de considérer les *associations* que nous étudions comme appartenant à un type particulier.

Si l'on exclue les infections pathologiques nettes il faut bien constater que les milieux scientifiques considèrent encore généralement la cellule végétale comme indemne de bactéries. La seule brèche importante reconnue dans ce dogme est représentée par les nodosités des Légumineuses. Il est tout à fait concevable, sur le plan théorique, qu'il puisse y avoir d'autres exceptions. A côté de relations aussi précises et tranchées que la symbiose, il y a certainement place pour des associations plus diffuses, plus lâches, moins obligatoires.

Bien entendu l'existence de bactéries dans un assez grand nombre de cellules saines pose beaucoup de problèmes : nous en évoquerons quelques-uns, mais essayerons de nous garder de généralisations abusives et prématurées dans lesquelles certains auteurs, nous le verrons, n'ont pas craint de s'engager. En effet, si cette étude est digne de retenir l'intérêt elle ne réclame seulement pour l'instant, pensons-nous, qu'une accumulation patiente de résultats précis d'observations, de déterminations et d'expériences.

CHAPITRE PREMIER

Historique

Avant d'aborder l'exposé de nos recherches il nous paraît indispensable pour mieux les situer, d'analyser les travaux antérieurs consacrés aux mêmes problèmes.

Il est parfaitement impossible de passer en revue même succinctement l'ensemble des relations entre les bactéries et les plantes supérieures. Pour être complet en effet il faudrait, dans une telle entreprise, considérer :

- 1° l'action des bactéries sur le substrat (microbiologie du sol).
- 2° les relations de voisinage (spermosphère et rhizosphère) et les échanges réciproques qui en découlent.
- 3° la pénétration et la présence des bactéries à l'intérieur des cellules végétales qui aboutissent à l'établissement de relations hostiles (maladie) ou équilibrées (symbiose).

Nous nous limiterons à l'étude du troisième de ces points en ne prenant donc en considération que les cas où les bactéries sont « **endophytes** ». Encore en ce domaine ne nous préoccuperons nous ni des phénomènes pathologiques ni des cas de symbiose typique bien connus pour lesquels on pourra consulter des mises au point récentes et spécialisées (1).

Deux raisons nous ont incité à commencer cette analyse historique par des travaux assez anciens, publiés à la fin du siècle dernier. Il s'agit d'abord du nombre très faible de publications consacrées jusqu'ici au domaine qui nous préoccupe. Il n'est pas possible, en second lieu, de tenir à l'écart de notre propos les vives, intéressantes et importantes

(1) ALLEN et ALLEN (1950).

controverses que certains résultats, ou plutôt certaines formulations et extrapolations de résultats, ont suscitées au moins à deux reprises (1884-1890 et 1910-1918).

Poussé par l'évolution propre du sujet et par l'origine, la spécialité et aussi les tendances aux généralisations de certains chercheurs, nous avons dû, délaissant la biologie végétale, entrer quelquefois dans le cadre de la biologie animale.

Tout en cherchant à rendre compte le plus objectivement possible des travaux antérieurs nous nous sommes cependant laissé entraîner par notre modeste connaissance du problème et nos propres résultats. Aussi avons nous parfois au cours de cette revue bibliographique, fait état, en quelque point, de critiques personnelles.

Enfin, certains travaux plus spécialisés par leur objet ou leur méthode se rattachent davantage à des aspects plus particuliers de nos recherches, nous en réservons l'exposé au début des chapitres qui leur correspondent.

I. — PREMIÈRE CONTROVERSE - 1884-1890

En 1884 le Belge JORISSEN de l'Institut pharmaceutique de Liège constate que, placés dans une atmosphère renfermant de l'acide cyanhydrique, des grains de maïs, d'orge ou de froment ne germent pas. Étant donné que l'embryon n'est pas tué par ce traitement et reste susceptible d'un développement ultérieur, il explique le défaut de germination par l'absence de sécrétion de *diastases*. La production de ces substances, plus souvent appelées *ferments* était en effet à l'époque très étudiée et controversée. Influencé certainement par ces travaux et aussi par le fait que l'acide cyanhydrique est un antiseptique puissant, cet auteur en vint donc, en généralisant, assez audacieusement, à écrire que la germination résultait de la sécrétion dans les grains de ferments diastatiques d'origine bactérienne. Rien, cependant, dans ses observations n'autorise JORISSEN à tirer une telle conclusion. Qu'après avoir plongé des graines, dont on ne dit pas si elles ont été stérilisées, dans une solution de nitrate de potassium celui-ci soit transformé en nitrite, il n'y a là rien de surprenant. Comment tirer argument de ce travail pour conclure à la présence de bactéries dans les graines ? En réalité, de l'aveu même de l'auteur, il semble que cette publication ait été rédigée hâtivement en raison d'une note préliminaire de l'allemand WIGAND (1884) sur le même sujet. La production de *diastases* y est attribuée là aussi à l'activité de bactéries, mais de plus, restaurant les idées de BECHAMP, l'auteur prétend que les micro-organismes prendraient naissance par génération spontanée (anamorphose du protoplasme).

Dans le même temps, MARCANO (1882 a) présentait à l'Académie des Sciences de Paris une note relative à l'existence, sur les téguments des caryopses de maïs, de vibrions qui communiquent des propriétés diastatiques aux liquides dans lesquels ils se trouvent et se développent pendant la germination de telle sorte que, si l'on fait des coupes de ces fruits, on aperçoit au microscope des « myriades d'organismes ». Un peu plus tard, le même chercheur (1882 b), en laissant tomber quelques

gouttes de sève d'Agave sur de la viande hachée, constate une fermentation peptonique qu'il attribue à un ferment figuré. Dans les conditions où ces travaux ont été exécutés, il est probable que les résultats eussent été identiques sans addition de sucres végétaux.

Dès lors, il n'est pas étonnant que, très rapidement, de vives critiques se soient levées contre ces travaux : en particulier, celles de LAURENT (1885) en Belgique.

Cet auteur s'attache d'abord à réfuter les arguments un à un, puis entreprend très méthodiquement, dans le cadre d'une critique positive, une série d'expériences sur l'existence de bactéries dans les tissus végétaux.

Dans une première série, des semences (*Lupinus*, *Zea*, *Hordeum*, *Helianthus*) stérilisées par le sublimé, sont mises à germer sur de la gélatine nutritive ou dans du jus de pruneaux : la germination a lieu sans que les milieux se polluent ; ceci prouve que les bactéries se trouvant habituellement à la surface des graines ne sont pas indispensables au déroulement de la germination.

L'auteur réalise ensuite les mêmes expériences avec des graines et des caryopses coupés et ne parvient pas à mettre en évidence l'existence de bactéries.

Puis, opérant sur des tubercules dans des conditions correctes de prélèvement aseptique, il plonge des fragments de ces végétaux dans des milieux de culture et exprime après quelques jours le nombre de tubes pollués par rapport au nombre d'expériences.

Il trouve :

<i>Solanum tuberosum</i>	2/5
<i>Cichorium Intybus</i>	1/4
<i>Beta vulgaris</i>	0/2.
<i>Allium Cepa</i>	1/2

LAURENT attribue ces développements bactériens à des pollutions extérieures. Il conclut donc, après un nombre d'expériences beaucoup trop faible, qu'il n'y a pas d'organismes étrangers dans les tissus végétaux à l'état normal et que la production de la *diastase* et des autres *ferments solubles* est bien un phénomène propre au protoplasme des végétaux supérieurs comme à celui des micro-organismes. On remarque aisément à l'analyse de ce travail que, s'il est conduit selon des méthodes tout à fait valables, les résultats obtenus ne sont pas suffisamment nombreux pour que l'on puisse leur attribuer une signification quelconque.

Deux années seulement après cette mise au point le docteur GALIPPE, médecin d'une clinique d'accouchement à Paris, semblant ignorer les travaux précédemment évoqués, fait part en 1887 de ses recherches sur la présence de micro-organismes dans les tissus végétaux. En tant que médecin il s'est visiblement posé la question de savoir si les germes pathogènes, en particulier le charbon, ne pouvaient pas, par l'intermédiaire du sol, passer dans les plantes potagères. Aussi s'est-il adressé à des végétaux développés sur des terrains d'épandage saturés de microbes (Plaine de Gennevilliers arrosée par des eaux d'égout). Il a ensemencé dans 7 milieux différents fort bien choisis et selon les techniques normales d'aseptie, des fragments végétaux très divers (carotte, oignon, céleri

rave, panais, navet, pomme de terre, betterave, laitue, salsifis, poireaux, choux, choux de Bruxelles, topinambour, ail). Pour l'ensemble de ces plantes les pourcentages d'ensemencements féconds varient entre 50 et 100 % sauf toutefois pour l'ail qui n'a donné naissance à aucune culture de bactéries. L'auteur regrette de n'avoir pas eu le temps ni les possibilités de déterminer les souches dont certaines sont chromogènes, remarque-t-il.

Une seconde série d'expériences menées selon les mêmes techniques, mais à partir de plantes développées en terrain normal aboutit approximativement aux mêmes résultats.

La conclusion tirée par GALIPPE est donc que les micro-organismes du sol peuvent pénétrer dans les tissus végétaux avec lesquels ils sont en contact : le mécanisme de cette pénétration n'est pas élucidé. Il resterait à déterminer, dit-il si la présence de microbes dans les végétaux est purement accidentelle ou s'ils jouent un rôle quelconque dans l'évolution du végétal.

La réponse ne se fit pas longtemps attendre puisque, la même année FERNBACH (1887), préparateur à la Sorbonne, reprend cette question de la présence supposée des bactéries à l'intérieur des tissus végétaux. Dès l'introduction il écrit : « on admet, par suite d'une tendance naturelle de l'esprit qui nous pousse à généraliser, que l'organisme des végétaux est, comme celui des animaux normalement fermé à la pénétration des microbes ». Cette tendance à généraliser le pousse naturellement à intituler clairement son article : « de l'absence des microbes dans les tissus végétaux ».

L'auteur rappelle les diverses publications sur ce sujet et notamment celle de PASTEUR (1872) sur les grains de raisin. Il s'appuie également, à tort à notre avis, sur une note de DUCLAUX (1885) qui montre que des graines stérilisées peuvent germer : ce qui veut dire seulement, à nos yeux, répétons-le, que les bactéries qui se trouvent à l'extérieur de la graine ne sont pas indispensables à la germination. Mais cette expérience ne renseigne absolument pas sur la présence de bactéries dans les tissus.

Puis, passant à la critique expérimentale FERNBACH reprend les expériences de GALIPPE mais avec seulement deux milieux (qui nous semblent assez mal choisis : bouillon de veau et bouillon de navet sucré). En opérant avec la tomate, le navet, la carotte, la betterave, la pomme de terre il trouve, pour 533 explantats 6,3 % d'ensemencements féconds qu'il attribue immédiatement à des pollutions extérieures. Ce qui conduit à la conclusion : « les tissus végétaux normaux constituent pour les microbes un filtre parfait, ils ne peuvent être envahis par eux qu'à la suite de causes tout à fait accidentelles ».

Le docteur GALIPPE répond immédiatement (1887) à ces objections « Je ne crois pas que les tissus vivants qu'ils appartiennent à des végétaux ou à des animaux opposent une barrière infranchissable à la pénétration des infiniments petits. Si mes expériences sont en contradiction avec les idées actuellement reçues dans la science je n'y attache pas d'importance attendu que le respect quand même des notions acquises ou réputées telles serait un obstacle au progrès de la science ».

Pour répondre à l'objection des pollutions atmosphériques il effectue des ensemencements avec une matière minérale (la pierre ponce) sans qu'aucun sur 79 ne soit fécond.

Examinant ensuite l'argument qui consiste à dire que tous les végétaux expérimentés ont été coupés et que par cette blessure les micro-organismes ont pu pénétrer, il refait une série d'explantats dans des végétaux soigneusement récoltés sans blessure : il aboutit aux mêmes résultats. Il maintient donc intégralement les conclusions de sa première note.

Cependant la controverse est loin d'être achevée. Ce sujet on le constate, anima fort certains esprits pendant la décade 1880-90. Cette fois c'est en Italie que DI VESTEVA (1888) également médecin, intitule l'année suivante une note : « De l'absence des microbes dans les tissus végétaux ». Ce travail se présente dès les premières phrases comme une réponse aux travaux précédents. Dans la partie expérimentale l'auteur, utilisant une technique très proche de celle de GALIPPE pour analyser l'intérieur des tissus de végétaux ayant poussé sur des terrains d'épandage, aboutit aux conclusions suivantes :

— les cultures dans le vide ou dans l'air obtenues à partir de plantes recueillies par l'auteur sont régulièrement restées stériles.

— si on abandonne les mêmes végétaux à l'air pendant 24 h ou plus, une nouvelle prise d'essai dans les trognons (ce travail a été effectué sur des trognons de laitue) donnent très souvent des ensemencements féconds.

— enfin, chaque fois que l'on opère sur des végétaux du commerce les résultats se sont montrés féconds selon un pourcentage moyen bien supérieur à ceux qui avaient été obtenus jusque là par d'autres auteurs.

DI VESTEVA n'est pas du tout embarrassé pour interpréter, en particulier, ce dernier point : il conclut que : « les jardiniers et les marchands, pour conserver aux produits leur fraîcheur naturelle les arrosent avec de l'eau très... riche en microbes ». Puis, maniant le paradoxe d'une façon très surprenante il écrit qu'il n'y a pas de dérogation à la loi selon laquelle les tissus végétaux normaux sont impénétrables pour les microbes. D'une part il admet donc, pour expliquer des résultats, que les bactéries déposées à la surface pénètrent dans les tissus et d'autre part pour reprendre des idées à l'honneur il déclare que les membranes sont impénétrables. Bien entendu il n'est pas possible de tenir compte de ces résultats.

Beaucoup plus prudentes et valables sont les critiques que LAURENT adresse à nouveau, en 1890 à la théorie de l'existence de micro-organismes dans les tissus végétaux sains. En ensemençant des milieux de culture avec de la sève de vigne, il n'obtient pas de prolifération bactérienne. Il pense donc que les vaisseaux des plantes ne renferment pas de bactéries.

Si l'on tente d'analyser l'ensemble des travaux publiés entre 1880 et 1890, dont nous venons de rendre compte, on remarque qu'ils ont en commun un certain nombre de caractères. Ils ont, d'une part tous été l'œuvre de médecins belges, italiens et français, très impressionnés par les découvertes et l'autorité de PASTEUR. Ils se sont tous, d'autre part, posé une seule question : les cellules végétales saines hébergent-elles normalement des micro-organismes ?

Les uns beaucoup plus influencés par des idées préconçues et une fâcheuse tendance à généraliser, répondent par la négative souvent sans s'appuyer sur de suffisantes preuves.

Les seconds mettent au point une méthode qui leur permet de répondre à la question par l'affirmative. Lorsque leurs résultats sont positifs il est bien facile à leurs adversaires d'avancer la possibilité de pollutions extérieures.

Quoi qu'il en soit le doute persiste : ce fut une période d'active controverse.

II. — DEUXIÈME CONTROVERSE - 1910-1923 : « les Symbiotes »

L'étude des bactéries associées aux tissus apparemment normaux, après avoir suscité les échanges que nous venons de relater, subit pendant une vingtaine d'années, de 1890 à 1910, une sérieuse éclipse. Pourtant l'un au moins des protagonistes GALIPPE, dont nous avons évoqué les travaux, après un long silence, qu'il mit sans doute à profit pour préciser ses idées, publie en 1917 : « Parasitisme normal et symbiose » ; le titre indique assez à lui seul le chemin parcouru. L'auteur défend, en biologie générale, la conception d'un parasitisme normal reposant sur des infiniment petits qui régleraient nécessairement l'activité cellulaire et seraient en quelque sorte la concrétisation la plus simple de la vie chez les êtres organisés.

On est surpris par la hardiesse de ces points de vue. Néanmoins pour les contemporains, ils ne sont pas tout à fait neufs. Les affirmations de GALIPPE s'inscrivent en effet dans un courant qui depuis une quarantaine d'années cheminait dans la pensée d'un certain nombre de scientifiques. L'apogée de ce mouvement est marqué sans aucun doute par la parution en 1918 du livre de PORTIER « les Symbiotes ». Cette publication relate essentiellement des travaux de biologie animale, elle est l'aboutissement d'idées la plupart du temps purement spéculatives selon lesquelles la vie cellulaire est obligatoirement symbiotique, elle fut enfin, comme nous le verrons, très sévèrement combattue dès l'année suivant la parution de l'ouvrage.

Examinons rapidement la genèse de ces conceptions.

ALTMANN (1890), utilisant une technique spéciale, met en évidence dans le cytoplasme de cellules animales très diverses la présence de petits organites dont les formes de grains simples ou associés en chaînettes offrent beaucoup de ressemblance avec les bactéries. Il note que ces corpuscules qu'il appelle *bioblastes* sont capables de se diviser et il leur donne la valeur d'unités morphologiques et physiologiques intracellulaires. Cet auteur compare la cellule avec ses bioblastes à une colonie de bactéries vivant au sein d'une zoogée. En fait ALTMANN vient de découvrir les mitochondries. Pour lui cependant ces granules font partie intrinsèque de la cellule ; il ne les considère pas comme des entités externes ayant pénétré dans l'organisme et s'étant adaptées à la vie intracellulaire. C'est au contraire une conception de ce genre qui est proposée et défendue

par DUBOIS (1887) ; ses travaux sur l'origine de la lumière dans le règne animal (formation de la pourpre chez *Murex trunculus*) placent le siège de la fonction chromogène dans des corpuscules intracellulaires qu'il appelle les « *vacuolides zymaziques* » ou « *sphérules élémentaires* ».

MERCIER (1907) considère les « *bactéroïdes* », dont sont bourrées chez les Blattes certaines cellules du corps gras, comme de véritables bactéries symbiotiques qu'il retrouve dès l'embryon. Ce fait est très diversement interprété et même complètement contesté par JAVELLY (1914).

Un peu plus tard PIERANTONI (1910) va préciser les précédents résultats. Ses premières recherches établissent la présence de levures symbiotiques, transmissibles par l'œuf, dans les cellules d'un tissu appelé mycétome au sein des corps jaunes d'un puceron (*Icerya purchasi*) (1). Des formations analogues étaient déjà connues chez d'autres insectes. BUCHNER (1918) confirme ces résultats et les étend à d'autres familles. PIERANTONI parvient à cultiver les levures *in vitro* et attribue à ces micro-organismes un rôle dans la production d'enzymes amylolytiques. Il tente ensuite (1918) d'étendre cette conception symbiotique au problème de la luminosité animale en particulier chez les Céphalopodes. Il constate que l'émission de la lumière est due à la présence de bactéries qui, chez l'animal, vivent dans les tubes glandulaires de l'organe lumineux et se transmettent régulièrement de génération en génération par l'œuf. L'un de ses collaborateurs ZIRPOLO (1917 et 1918) détermine ces bactéries photogènes. Puis, se laissant entraîner, PIERANTONI tente d'étendre ses résultats à tous les animaux producteurs de lumière, enfin de là à toutes les actions diastasiques. Il attribue aux inclusions cytoplasmiques une origine externe, une vie autonome et une activité spécifique dont bénéficie la cellule : c'est la « *symbiose physiologique héréditaire* » (1919).

Vint alors en 1918 la parution de : « Les Symbiotes » de PORTIER. S'appuyant sur ses propres travaux (1911), portant sur la présence d'un champignon du genre *Isaria* dans le tube digestif d'une chenille xylophage, ainsi que sur les résultats de PIERANTONI, il formule de façon très rigide et souvent théorique des idées très générales remettant en question des notions fondamentales de la biologie.

Dès la préface de son ouvrage (2) la théorie est parfaitement définie. La cellule n'est pas l'unité fondamentale de la vie ; elle est essentiellement un complexe symbiotique. Les mitochondries sont des symbiotes. Dans l'immense majorité des cas l'adaptation des symbiotes au milieu cellulaire est devenue si parfaite, leur transformation si profonde que l'association est très difficile et probablement impossible à rompre. Le micro-organisme est définitivement domestiqué, il est incapable de vivre en dehors de la cellule. On peut donc distinguer, selon l'auteur :

— des êtres autotrophes : les bactéries chez lesquelles les recherches histologiques les plus soignées n'ont pu mettre en évidence de mitochondries ou symbiotes,

— des êtres hétérotrophes : végétaux et animaux chez lesquels on a pu découvrir des symbiotes. Tous ces organismes sont constitués par « l'emboîtement » de deux êtres différents.

(1) De l'avis de CAULLERY (1922) ces résultats sont indiscutables.

(2) Nous donnons en annexe (A1 p. 185) un extrait textuel.

Le cytoplasme et le noyau de la cellule pourraient être élaborés par les symbiotes. Ceux-ci, d'après PORTIER, ne se développeraient pas en concurrence vitale avec la cellule, ils ne l'envahiraient jamais au point de l'infecter véritablement et de la détruire. Ils seraient les auxiliaires indispensables du métabolisme de la cellule, sans que celle-ci en souffre et sans que le symbiote lui-même soit digéré. Il y aurait, dans cet état de vie en commun, un équilibre intracellulaire parfait sans lutte des éléments constituant l'association symbiotique.

Les êtres vivants, poursuit l'auteur, doivent être réensemencés en symbiotes à intervalles plus ou moins fréquents sous peine de s'acheminer vers une déchéance progressive. Chez les Végétaux ce sont les mycorhizes qui pourvoient à ce réensemencement ; chez les Animaux ce sont les aliments d'origine végétale.

Les symbiotes que PORTIER a isolés et cultivés sont des aérobies stricts, leur température optimale de culture varie avec leur origine, ils sont très polymorphes et résistent très bien à la chaleur : ils sont donc caractérisés par leur grande malléabilité physiologique et morphologique (1).

Bien entendu devant de telles affirmations on reste perplexe. La lecture de l'ouvrage frappe surtout par la façon dont l'auteur, entraîné par son imagination, a pu exploiter un très petit nombre de faits scientifiques d'observation ou d'expérimentation pour formuler des théories générales bouleversant complètement, de son aveu même, les notions classiques et régissant à la fois le règne animal et végétal. Cette attitude s'explique peut-être par des circonstances historiques (1918) ou le contexte scientifique très marqué notamment par les travaux sur les nodosités des Légumineuses.

Quoi qu'il en soit, comme on pouvait le prévoir, la critique ne se fit pas attendre. Dès l'année suivante LUMIÈRE (1919) publiait le « Mythe des Symbiotes ». L'auteur ne conteste pas le fait que la vie des cellules à l'état physiologique normal ou sensiblement normal soit quelquefois compatible avec la présence de micro-organismes dans les tissus, mais s'insurge contre la généralisation abusive de ce fait et la théorie de « l'emboîtement ». LUMIÈRE a réalisé de nombreux essais qui l'amènent à conclure que la symbiose (au sens de PORTIER) n'existe pas et que les spores de saprophytes isolées qui sont rencontrées par accident dans les tissus normaux ne jouent aucun rôle dans le métabolisme de la cellule. Les exemples de symbiose que l'on rencontre dans la nature, rappelle-t-il d'autre part, correspondent toujours à une lutte entre le parasite et la cellule et non à un état d'équilibre vital entre ces deux éléments. Enfin, affirme-t-il, on ne saurait confondre mitochondries et bactéries.

Sur ce point particulier les cytologistes GUILLIERMOND, LAGUESSE et REGAUD rejettent formellement et presque simultanément (1919), l'identité que prétend établir PORTIER entre les mitochondries et les bactéries symbiotes. Ces spécialistes, ils le soulignent eux-mêmes nettement, limitent leurs critiques à cette partie des conceptions de l'auteur. Ils reconnaissent que la symbiose est susceptible de jouer un rôle beaucoup plus important que l'on ne l'a admis jusqu'ici et ils considèrent que le

(1) L'américain WALLIN (1922) s'est rallié aux opinions de PORTIER.

nombre de cas connus de symbiose puisse aller en augmentant. Cependant, remarquent-ils, malgré l'analogie morphologique, il existe de profondes différences entre les mitochondries et les bactéries. Les premières en effet, sont très fragiles et extrêmement sensibles aux variations de pression osmotique et de température, elles sont très altérées par les fixateurs à base d'alcool, de chloroforme et d'acide acétique, tandis que les secondes résistent beaucoup mieux à ces réactifs et à la chaleur. PORTIER a d'ailleurs noté lui-même la très grande résistance des bactéries symbiotes à la chaleur.

Plus tard MILOVIDOV (1928 a et b) revient encore sur cette question et met au point une méthode de double coloration permettant de différencier le chondriome des bactéries. Il applique cette technique, que nous avons nous-même employée et décrirons plus loin, à l'observation des bactéries symbiotes dans les tubercules radicaux de plusieurs Légumineuses (*Lupinus*, *Trifolium*, *Galega*, *Carmichaelia*) dans les espaces intercellulaires des feuilles d'*Ardisia*, *Pavetta*, *Dioscorea* et aussi dans certains tissus animaux. Il peut dans ces conditions distinguer au sein des cellules les bactéries et le chondriome.

Ce travail met un terme à la discussion : les chondriosomes ne sont pas des bactéries symbiotes. La théorie cellulaire classique subsiste, la symbiose reste un phénomène réel mais exceptionnel : on ne peut prétendre qu'elle représente la forme fondamentale de la vie cellulaire. Ainsi s'achève cette période de controverse animée surtout par des travaux de biologie animale et centrée essentiellement sur un travail certes assez captivant par l'ampleur et l'audace de ces conceptions mais, qui, reposant sur des bases expérimentales beaucoup trop fragiles, est finalement par ses exagérations de nature à discréditer un sujet qui mérite pourtant pensons-nous, en biologie végétale, de retenir l'attention.

III. — NOEL BERNARD ET SES TRAVAUX SUR LA POMME DE TERRE

Nous ne pouvons quitter la période précédente sans rappeler au moins brièvement les passionnantes recherches de BERNARD. En effet, il s'est beaucoup lui aussi intéressé à la symbiose, mais surtout, et c'est essentiellement pour cette raison que nous ne voulons pas négliger d'en parler, l'étude de la pomme de terre représente une partie importante de ses travaux ; nous avons, en effet, nous le verrons, consacré à cette plante la majeure partie de nos propres recherches.

BERNARD (1902 a), on le sait, commença sa carrière en montrant que la germination des *Neottia nidus avis* ne peut s'effectuer dans la nature que lorsqu'un champignon endophyte, associé à la plante adulte, a pénétré dans l'embryon. Ce chercheur réussit ensuite à obtenir la germination des graines d'Orchidées *in vitro* en présence d'une culture

de *Rhizoctonia repens* (1909). Cela fut, notons-le au passage, l'occasion de démontrer l'existence d'une immunité humorale chez les végétaux (1911 a) (1).

Puis BERNARD étudie, chez les Ophrydées, les rapports entre la symbiose et la tubérisation (2) et montre expérimentalement que cette dernière est la conséquence et le symptôme de l'invasion des racines par des champignons symbiotiques.

Ce savant est alors tenté de vérifier la généralité de cette découverte et, par une extrapolation assez audacieuse mais cependant féconde, il choisit pour cela la pomme de terre dont le cycle évolutif ressemble assez étroitement à celui des Ophrydées (alternance d'une phase de différenciation et de tubérisation). N'ayant obtenu aucun résultat en partant de plantes cultivées il entreprend alors l'étude de Solanées sauvages (*Solanum Dulcamara*) et conformément à ses prévisions il trouva dans leurs racines une large infestation par un champignon (1911 b et c). Peu de temps après, il fait les mêmes observations à partir de pommes de terre sauvages (*Solanum maglia*) originaires d'Amérique du Sud. (M^{me} BERNARD et MAGROU, 1911 ; BERTHAULT, 1911).

Pour BERNARD les pommes de terre cultivées se sont affranchies de leur endophyte en raison des conditions physico-chimiques, notamment de pression osmotique, créées dans le sol par les pratiques culturales et remplaçant l'action du champignon. BERNARD (1902 b) lui-même, mais surtout plus tard MOLLIARD (1915, 1939) et MAGROU (1939, 1941), ont précisé la nature des conditions équivalant à la symbiose. La production des tubercules est caractéristique d'un certain degré de concentration de la sève. Ces auteurs ont pu provoquer expérimentalement la formation de tubercules, en culture aseptique *in vitro*, en apportant des glucides soit par le milieu nutritif soit en augmentant l'assimilation chlorophyllienne. Il est donc logique de penser que le champignon endophyte agit de la même façon : hydrolysant l'amidon, il augmente la pression osmotique cellulaire jusqu'au niveau compatible avec la tubérisation (MAGROU, 1943).

IV. — SCHANDERL ET LA THÉORIE DE LA « TRANSMUTATION »

SCHANDERL de l'Institut de Botanique de Geisenheim s'est très vivement intéressé, depuis 1939, à l'existence de bactéries dans les tissus des végétaux apparemment sains ; son travail mérite d'être analysé.

Dans un premier et long article (1939) il donne beaucoup de techniques d'isolement et conclut :

1° chez les Légumineuses, *Bacillus radicolica* n'est pas uniquement localisé dans les nodosités, on peut le rencontrer dans tous les organes de la plante.

(1) Étudiée ultérieurement par d'autres scientifiques : MAGROU (1918-1920), CAPPELLETTI (1924), NOBECOURT (1927).

(2) L'auteur donnait à ce terme un sens très large englobant la formation de bulbes, de rhizomes ou de tubercules.

2° des bactéries de type *Bacillus radicolica* peuvent être isolées de plantes n'appartenant pas à la famille des Légumineuses, notamment des espèces rudérales (Composées, Crucifères, Graminées, Caryophyllacées).

3° chez *Diplotaxis tenuifolia* les bactéries symbiotiques peuvent fixer l'azote atmosphérique.

4° des micro-organismes, généralement assez mal situés dans la classification, ont été obtenus à partir des tissus internes de tubercules, fruits et feuilles succulentes.

Dans les publications suivantes SCHANDERL (1942, 1947, 1953, 1962 a et b) précise ses résultats, répond aux violentes critiques qui ne tardent pas à être formulées (BURCIK, 1940, RIPPEL, 1940, FISCHER, 1948) et développe ses conceptions sur la signification de l'association entre les bactéries et les plantes. A cet égard il s'agit, à notre avis, d'une remise à l'honneur de la thèse de « l'emboîtement » de PORTIER. « La cellule végétale, selon lui, n'est pas la plus petite unité de vie de la plante, chaque cellule est une somme d'unités de vie plus petites ». « On ne devrait pas parler, dit-il encore, d'expériences d'isolement de bactéries à partir d'un tissu végétal sain et normal mais bien de tentatives de régénération de plus ou moins petites unités de vie de la cellule végétale en formes de vie indépendantes : les bactéries ».

En effet, d'après les écrits récents de cet auteur les bactéries isolées proviendraient de la transformation non seulement des mitochondries mais aussi des autres organites de la cellule (noyau, chloroplastes et autres plastes). Ces conclusions s'appuient sur des expériences qui consistent à introduire localement dans des tomates vertes par exemple des cristaux stériles de KHCO_3 et à prélever toutes les 12 ou 24 h, en prenant toutes les précautions de stérilité, des fragments de tissus plasmolysés à la suite de cet apport. Le 5^e jour des bactéries indépendantes et mobiles apparaissent. La « *transmutation* » des organites cellulaires se déroule de la façon suivante : stade des filaments, stade bactéroïde, stade des bactéries groupées en colonies, phase de sporulation.

Envisageant ce problème au point de vue de l'évolution SCHANDERL (1) pense qu'au cours de l'expérience de la plasmolyse on détruit la vie de la cellule sans toucher à celle des organites qui s'y trouvent. Ces derniers reprennent alors leur individualité comme il y a des millions d'années avant qu'ils se soient unis à un organisme supérieur.

Cet auteur, a pris l'initiative pour renforcer ses positions, d'analyser dans « Der Kartoffelbau » (SCHANDERL 1963) les résultats que nous avons jusqu'ici publiés. Il écrit notamment : « ses (2) travaux étant illustrés de microphotographies on peut se rendre compte que les bactéries se régénèrent à partir des organites cytoplasmiques en passant par des formes intermédiaires ». Nous tenons à préciser que si la rédaction de cet article nous avait été soumise avant publication, ce passage au moins eût été supprimé. Dans l'ensemble de nos recherches nous n'avons rencontré aucun indice permettant d'accréditer la thèse de la « *transmutation* » émise par SCHANDERL : nous la considérons comme une pure spéculation.

(1) Dans une lettre du 6/8/63.

(2) Il s'agit de nos publications.

V. — OBSERVATIONS ET CONCEPTIONS DIVERSES

Dans le cadre de cet historique seuls des problèmes assez généraux et les controverses qu'ils suscitèrent ont retenu jusqu'ici l'attention. Pourtant, dans le même temps, parurent un certain nombre de travaux moins importants, plus particuliers, plus courts et plus variés ; ils méritent d'être succinctement analysés.

De 1890 à 1938 seulement peu d'auteurs, souvent de langue allemande, s'intéressèrent à la présence de micro-organismes à la surface ou à l'intérieur des organes végétaux.

Trois chercheurs durant cette période ont étudié la survie de micro-organismes inoculés au sein des tissus. Certes avant eux VAN TIEGHEM (1884) avait constaté que si l'on plonge dans un milieu renfermant le *Bacillus amylobacter* un fragment de tige de façon à ce qu'une partie soit immergée et l'autre émergée, on constate que les micro-organismes montent, dans la tige, légèrement au-dessus du niveau de l'eau, mais sont arrêtés là dans leur progression. LOMINSKY (1890), par ailleurs, ayant cultivé du blé dans de la terreensemencée avec des bactéries pathogènes connues, prétend retrouver ces microbes dans la tige et les feuilles de la plante.

Mais en 1894 RUSSEL va développer ces idées très méthodiquement. Sa méthode consiste à inoculer des bactéries à un niveau donné du végétal et à étudier ensuite à quelle distance du point de départ on peut retrouver les micro-organismes. Il détermine aussi quelle est la durée de leur survie (*Tableau 1*).

L'ensemble de ses expériences permet à l'auteur d'aboutir aux conclusions suivantes :

- un très grand nombre d'espèces bactériennes, contrairement à ce que l'on pensait, peuvent vivre dans les cellules des plantes supérieures quelquefois pendant longtemps.
- celles qui y vivent le plus longtemps sont les espèces saprophytes.
- parmi les parasites animaux peu de germes peuvent vivre longtemps dans les végétaux.
- non seulement beaucoup d'espèces peuvent vivre dans la plante de 40 à 80 jours mais beaucoup d'entre elles sont capables d'envahir les tissus voisins jusqu'à une distance de 2 à 5 cm du point d'inoculation.
- la pénétration se fait dans le sens vertical de bas en haut.
- les bactéries sont intracellulaires : elles pourraient traverser les membranes.

Ces faits dit l'auteur expliquent que l'on ait pu mettre en évidence l'existence de bactéries dans les plantes saines. Il y aurait dans ce cas pénétration de micro-organismes par des lésions invisibles des plantes. Mais ce chercheur pense que normalement la plante saine est exempte de bactéries.

ZINSSER (1897), après s'être rangé à l'avis de FERNBACH selon lequel les tissus végétaux normaux sont stériles, précisait qu'après avoir,

Bactéries	Durée de l'incubation en jours	Plante hôte	Résultats
<i>B. prodigiosus.</i>	27	<i>Tradescantia</i>	++
id.	103	id.	0
id.	10	<i>Geranium</i>	+
id.	42	id.	++
<i>B. butyricus.</i>	42	id.	++
id.	13	<i>Phaseolus</i>	+
<i>B. luteus.</i>	40	<i>Geranium</i>	++
<i>B. megaterium.</i>	11	<i>Phaseolus</i>	+
id.	11	id.	0
id.	44	<i>Geranium</i>	+
<i>B. coli.</i>	19	id.	++
id.	20	id.	++
<i>B. ac. lactici.</i>	35	id.	++
<i>B. fluorescens.</i>	48	id.	++
<i>B. lactis aerogenes.</i>	10	id.	+

++ grand nombre de bactéries,
 + nombre modéré,
 0 absence de bactéries.

Tableau 1. — Action des saprophytes sur les tissus végétaux (d'après RUSSEL).

dans des racines, des tiges et des feuilles, inoculé des bactéries, celles-ci ne se déplacent et ne se développent que très peu à l'intérieur des tissus.

Tel était aussi à peu près l'avis de BERTHOLD (1917). Il sectionne transversalement une plante ligneuse, dépose sur la surface de coupe une suspension bactérienne et constate que, selon les végétaux, les micro-organismes pénètrent dans l'organe à des distances correspondant à la longueur des vaisseaux de la plante étudiée. Les cloisons transversales de ces derniers se comportent donc comme des filtres. La survie des bactéries dans les tissus peut atteindre 10 mois mais elles ne prolifèrent pas.

Si NESTLER (1899) a pu isoler des champignons à partir des tissus internes du fruit de *Juniperus communis*, c'est essentiellement aux bactéries de la surface des plantes que furent consacrés les travaux de BURRI (1903) et DUGGELI (1905 et 1906). Leurs articles n'ont plus aujourd'hui qu'un faible intérêt et présentent des tableaux donnant des renseignements d'ordre qualitatif (*Bacterium radicum*, *B. aureum*, *B. fluorescens*) et quantitatif sur les bactéries se trouvant à la surface de fruits, semences, jeunes pousses et tiges de plantes diverses, notamment des Graminées.

HILTNER (1904), de son côté, s'est intéressé à la surface mais aussi à l'intérieur des tissus des racines dont il isola des bactéries. Le premier il proposa le terme de « *bacteriorhiza* » pour interpréter ses résultats.

Ayant examiné des plantes d'*Ardisia crispa* dont les feuilles portent de petits nodules bactériens, VOUK (1913) a retrouvé des bactéries également dans la graine (embryon et albumen), la fleur et le pédoncule du fruit.

En 1917, nouvelle réaffirmation de la stérilité des tissus végétaux ; pour BERTHOLD les tissus normaux des plantes herbacées et ligneuses, n'hébergent pas de bactéries.

Au contraire, si l'on en croit CAUDA (1925), la maturation de certains fruits (*Pirus Malus*, *Mespilus*, *Musa* etc...) résulterait d'une activité microbiologique exercée à l'intérieur de ces organes par des bactéries (*Bacillus Piri* CAUDA et *Bacillus Mali* CAUDA).

PEROTTI (1926) dont les travaux et écrits sont postérieurs à ceux de PIERANTONI et PORTIER a visiblement conservé de ce dernier la notion de « *micro-organismes physiologiques* ». Il a pu isoler des bactéries à partir de racines d'abord de *Diplotaxis erucoides* et *Calendula officinalis* (1919-1920) puis ensuite (1922) de nombreux phanérogames (Caryophyllacées, Chenopodiacées, Composées, Crucifères, Euphorbiacées, Graminées, Labiées, Malvacées, Papaveracées). Les bactéries sont inter et intracellulaires et sont seulement situées dans la zone corticale des racines. L'auteur ne se préoccupait pas de savoir si les micro-organismes isolés sont ou non fixateurs d'azote, il pensait plutôt à l'intervention par la sécrétion d'enzymes. Pour lui la présence des bactéries pourrait ne pas être nécessaire, mais elle serait néanmoins sans doute avantageuse. L'étude biologique du sol devrait, pense-t-il, s'étendre des limites de l'*édaphosphère* (sphère générale d'élaboration des aliments) à celle plus précise de l'*histosphère* (sphère de rapports intimes entre bactéries et organes radiculaires). On passerait du « *microbe* » à peine influencé par les produits reflusés de la vie d'une espèce déterminée au « *microbe* » ayant pénétré dans les méandres de l'agencement de la plante (*bacteriorhize*). On atteindrait ensuite des conditions d'équilibre qui uniraient les micro-organismes à la plante d'une manière plus ou moins indissoluble (*ultra-symbiose*).

Après ces considérations intéressantes mais parfois un peu grandiose et théoriques, il faudra attendre jusque 1938 pour que l'on commence, la plupart du temps isolément, à s'intéresser à la présence de bactéries au sein des tissus.

Entre temps et dans un domaine voisin, les recherches de CAPPELLETTI et CERUTI (1933-1939) desquelles on peut rapprocher celles de NIETHAMMER (1943), établirent l'existence de champignons (*Cladosporium herbarum*, *Eurotium repens*, etc...) dans les ovules de plantes alpines (*Calluna vulgaris*, *Pirola secunda*, *Campanula barbata*, *Rhododendron hirsutum*) ; cette infestation ne semble pas nuire à la maturation normale des graines.

En 1939, année qui marqua la première publication de SCHANDERL, ROMWALTER et KIRALY (1939), élèves de SZILVASI — qui ne publia qu'un peu plus tard (1942) — effectuèrent des travaux expérimentaux sur des fruits de *Ribes grossularia* et *Vitis vinifera*. Ils arrivèrent à la conception que les levures (*Saccharomyces* sp.) ne se trouvent pas uni-

quement à la surface des fruits mais aussi à l'intérieur de la pulpe. En enfermant des fruits stérilisés dans des récipients clos ils constatèrent qu'il se produit une fermentation aboutissant à la mort des cellules. Celle-ci est attribuée à la présence, à côté des levures, de bactéries anaérobies ; à l'air cette transformation ne pourrait s'effectuer en raison de l'inhibition exercée par l'oxygène de l'air.

HENNIG et VILLFORTH (1940), élèves de SCHANDERL, trouvèrent des bactéries (une seule détermination : *Bacillus planticola rubescens*) dans de nombreux organes de beaucoup de plantes (ortie, radis, pomme de terre, tomate). Devant les critiques qui s'élevaient ils affirmèrent que la stérilisation des surfaces donnait la certitude que les bactéries sont bien dans les organes. Ils étendirent ces conclusions à toutes les plantes et firent de la symbiose fixatrice d'azote une nécessité.

STUHRK (1941) et ELFVING (1941) partagèrent ces points de vue.

Ces affirmations exagérées furent tempérées par quelques avis plus restrictifs. MARCUS (1942) confirma que de l'intérieur des fruits sains on peut isoler des champignons, levures ou bactéries, mais cela n'est pas général. Par exemple dans 91 % des cas il a pu extraire le *Bacillus vulgatus* des fruits de *Cucurbita Pepo*. La pénétration de l'hôte aurait lieu par le stigmate. Pour lui les fruits des céréales hébergent des champignons de familles différentes (Tableaux dans la publication). Aucun micro-organisme n'a pu être isolé des graines de *Vicia Faba*, de fruits de *Viscum*, « *Pirus* » et « *Malus* ». Par contre la pulpe des fruits de *Prunus cerasus* et *Ribes Uva crispa*, contient des levures et des bactéries. Pour l'auteur ces phénomènes ne sont pas spécifiques, ils n'appartiennent pas nécessairement à la symbiose ; il s'agirait plutôt de maladies d'infection inhibées.

En 1940, à la suite d'une publication de SCHANDERL, BURCIK s'était élevé contre l'idée de la présence de bactéries dans les cellules apparemment normales des plantes. Un peu plus tard (1948), à la suite de ses propres travaux, il nuança son opinion. Reconnaisant la présence de micro-organismes au sein des tissus, il ne lui attribue qu'un caractère exceptionnel d'infection. Il relate lui-même l'isolement de bactéries à partir de tubercules de *Solanum tuberosum*, des graines de *Vicia Faba* des fruits de *Solanum Lycopersicum* et pense que la pénétration des parasites s'effectuerait par le style.

BUCHTA (1948) parvint à des résultats analogues en étudiant des graines de Légumineuses.

La même année SANFORD indiqua qu'il isolait régulièrement des bactéries à partir de tubercules de *Solanum tuberosum*, des tiges de *Phaseolus vulgaris* et des racines de *Medicago* et *Melilotus*. Une seule espèce a été déterminée : *Bacillus radiobacter*. La stérilisation du sol par la vapeur, la désinfection des lots, la plantation de tubercules entiers ou coupés, n'ont pas de répercussion sur le nombre de micro-organismes isolés des tiges.

TERVET et HOLLIS (1948) firent des constatations analogues (pomme de terre, carotte, navet et betterave). Ils considèrent que les bactéries (prédominance de Gram —) présentes seulement en faible nombre, pénétreraient soit par les cicatrices des blessures naturelles causées par l'émer-

gence des radicelles secondaires soit par les lenticelles des organes de réserve. HOLLIS seul revient en 1951 sur cette question et isole des tissus de la pomme de terre un certain nombre d'espèces bactériennes (*Bacterium globiforme* Conn, *Aerobacter cloacae* Jordan et *Bacillus megaterium* De Bary) quis ont surtout localisées dans les régions très vascularisées des tubercules.

Un peu plus tard, THOMAS et GRAHAM (1952) révèlent l'existence de bactéries apparemment passives dans les tissus des haricots sains.

Ayant examiné des organes divers (tiges, feuilles, racines) de végétaux très variés (*Dactylis glomerata*, *Malva silvestris*, *Gallium Mollugo*, etc...) TONZIG et BRASSI-ORSENICO (1955) confirmèrent les travaux d'isolement de bactéries publiés précédemment, notamment par SCHANDERL ; mais ils ne défendirent pas la conception de la symbiose obligatoire ni celle de la transmutation.

Un peu plus tard, PHILIPSON et BLAIR (1957) montrèrent qu'il existe une flore bactérienne assez diverse dans les racines de *Trifolium pratense* et *T. subterraneum*. Parmi les espèces isolées figurent : *Flavobacterium rhenanus*, *Bacillus megaterium* et *Aerobacter cloacae*. La même année, SMITH et NIVEN relatèrent l'isolement de *Leuconostoc mesenteroides* (cocci Gram +) à partir des taches grises apparaissant dans les tissus de tubercules de pomme de terre (variété White rose). DAWID (1957) de son côté examina la possibilité de développement des bactéries dans les tissus de tomate.

Il faut enfin signaler les travaux entrepris, en relation avec SCHANDERL, à l'Institut de recherches alimentaires de Revohot (Israël). Là, en effet, SAMISH et ses collaborateurs (1957 et 1959) isolèrent à partir des fruits de concombre, en prenant toutes les précautions d'aseptie, des bactéries non déterminées. Le nombre moyen de celles-ci par ml de jus de fruit est considérable (4.000). La population bactérienne s'accroît à mesure que les prélèvements sont effectués plus loin de l'insertion sur la tige.

Travaillant sur le fruit de la tomate, le même auteur et ses collaborateurs (1961) précisèrent qu'ils pouvaient en isoler de nombreuses espèces bactériennes. Celles-ci appartiennent au groupe des Gram — : sur 43 obtenues, 6 sont des *Enterobacteriaceæ*, 3 des *Achromobacteriaceæ* et 34 des *Pseudomonadaceæ*. Sur 172 tomates examinées, 59 contenaient moins d'une bactérie par cm³ de jus, 51 en hébergeaient de 1 à 300, les autres davantage. Aucune théorie n'est avancée pour expliquer le mode de pénétration des micro-organismes dans les organes.

De la graine de *Datura stramonium*, KARDOS (1964) a isolé des micro-organismes (non déterminés) qui peuvent élaborer un facteur présentant les propriétés pharmacologiques et biologiques de l'atropine.

Enfin, dans le cadre de cette étude historique des travaux consacrés à la présence non pathologique de micro-organismes dans les tissus végétaux, il faut rappeler, en dehors de la famille des Légumineuses, exclue de notre propos, la présence de nodosités radiculaires dans certains genres disséminés parmi les Dicotylédones (Tableau 2, p. 29).

On note aussi chez un certain nombre de plantes des excroissances foliaires d'origine bactérienne. VON FABER (1914), après ZIMMERMANN

Familles	Genre et espèces	Auteurs
Betulaceæ.	<i>Alnus viridis.</i>	PEKLO (1910).
Elæagnaceæ.	<i>Eleagnus angustifolia.</i>	HILTNER (1898).
	<i>Hypophae rhamnoides.</i>	BRUNCHORST (1886).
	<i>Shepherdia argenta.</i>	WARREN (1910).
Myricaceæ.	<i>Myrica gale.</i>	ARCULARIUS (1928).
Rhamnaceæ.	<i>Ceanothus americanus.</i>	KELLERMAN (1911).
Casuarinaceæ.	<i>Casuarina muricata.</i>	JANSE (1897).
Coriariaceæ.	<i>Coriaria japonica.</i>	KATAOKA (1930).
Zygophyllaceæ.	<i>Fagonia arabica.</i>	} SABET (1946).
	<i>Zygophyllum album.</i>	
	<i>Tribulus alatus.</i>	
Rubiaceæ.	<i>Coffea robusta.</i>	STEYAERT (1932).

Tableau 2. — Présence de nodosités radiculaires chez des Dicotylédons autres que les Légumineuses (1).

(1902), étudia en détail de telles formations chez des Rubiacées tropicales (genres *Pavetta* et *Psychotria*). Les bactéries se trouvent d'abord, dans les bourgeons, enrobées dans une substance gommeuse secrétée par la plante. Puis elles pénètrent par des fentes entre les cellules épidermiques ; il se forme alors des lacunes où les bactéries se multiplient détruisant les cellules voisines et formant un nodule.

Les micro-organismes passent dans les fleurs et les ovules et on les retrouve dans les graines entre l'embryon et l'albumen. On a pu éliminer les bactéries par la chaleur à l'intérieur des semences ; les plantes qui en sont issues sont plus faibles. Si on inocule les plantules asymbiotiques on obtient des individus normaux. Les bactéries exercent donc, dans ce cas, une action favorable sur le développement de leur hôte ; le mécanisme de cette intervention reste encore obscur.

Des faits analogues ont été signalés

— par MIEHE (1914) puis NEMEC (1932) pour une Myrsinacée tropicale (*Ardisia crispa*).

— par ORR (1923) qui a observé des bactéries dans les espaces intercellulaires des pointes de feuilles de *Dioscorea macroura*.

— par GEORGEVITCH (1916), chez *Kraussia floribunda*.

On attribue enfin, à une algue (*Anabaena cycadeæ*) la formation de nodosités sur les racines de *Cycas*. BOTTOMLEY (1909) avait également décelé dans ces nodules la présence de *Bacillus radicitcola* et *Azobacter*. SPRATT (1911) puis DOUIN (1953) s'intéressèrent aussi à cette question. Ce dernier montra que l'*Anabaena* peut croître sur des milieux dépourvus d'azote combiné et conclut donc à la réalité de la symbiose entre l'algue et le *Cycas*.

(1) Le lecteur intéressé pourra consulter RUHLAND (1961). Vol. VIII, p. 95.

Avant de clore ce chapitre, soulignons que, si nous avons parfois émis quelques critiques, nous sommes cependant le plus souvent resté sur le plan historique. La relation d'un travail ne signifie donc nullement que nous approuvions les méthodes utilisées et les résultats ou interprétations annoncés.

Ayant tout d'abord porté intérêt à la polymérisation de la cellulose dans les membranes végétales (MONTUELLE 1954, 1955) nous avons, à la suite de travaux de ce type effectués sur des axes hypotylés de *Phaseolus vulgaris* (HOCQUETTE et MONTUELLE 1955) et du fait de la présence constante de bactéries nitrifiantes intervenant dans ces expériences (HOCQUETTE et BUSTRAEN 1953), été amené à étudier la stérilité externe puis interne de ces organes. Ce fut le point de départ expérimental de nos recherches.

CHAPITRE II

Isolement des bactéries.

Détermination et répartition.

I. — LES CONDITIONS GÉNÉRALES DE TRAVAIL

1° La chambre stérile :

Pour effectuer toutes les opérations de mise en culture et de broyage d'organes, d'isolement et de repiquage des bactéries dans les meilleures conditions possibles, c'est-à-dire en éliminant au maximum toutes les possibilités de contamination extérieure, nous avons installé une petite pièce (12 m³) stérilisée par les rayons ultra violets (4 tubes de 85 cm Philips 57413 P40 30 W) dont nous avons vérifié l'efficacité comme suit.

Si l'on ouvre dans un endroit quelconque du laboratoire un certain nombre de boîtes de Pétri renfermant un milieu de culture gélosé, stérile, pendant des temps compris entre 15 s et 5 mn, on constate après incubation de 48 h à 37° C, que des champignons et de nombreuses colonies bactériennes se sont développés (*pl. I* en bas). Les opérations correspondantes sont effectuées dans la chambre stérile préalablement éclairée pendant 2 h. Que l'ouverture des boîtes ait lieu après extinction des lampes (*pl. I* au milieu) ou pendant leur fonctionnement (*pl. I* en haut) on remarque qu'il ne se développe pratiquement plus aucun organisme à la surface de la gélose (2 à 4 colonies bactériennes pour une ouverture de 5 mn).

Nous considérons donc que les conditions de travail dans la chambre stérile sont tout à fait satisfaisantes après 2 h d'éclairement en U.V.

2° Le matériel végétal :

Les végétaux que nous avons étudiés et dont on trouvera la liste au *tableau 3* (p. 32) étaient tous indemnes de maladies connues.

Familles	Genres et espèces	Noms français	Organes étudiés
Solanacées	<i>Solanum tuberosum</i> L. var. Bintje Saskia Eesterling Viola Roseval	pomme de terre	tubercules
Chenopodiacées	<i>Beta vulgaris</i> L.	betterave	racines tubérisées
Composées	<i>Daucus Carota</i> L. <i>Cichorium Intybus</i> L. <i>Helianthus tuberosus</i> L. <i>Apium graveolens</i> L.	carotte chicorée topinambour céleri	id. id. id. id.
Crucifères	<i>Brassica Napus</i> L. var. <i>esculenta</i> <i>Raphanus sativus</i> L. var. <i>niger</i>	choux-navet radis noir	id. id.
Graminées	<i>Triticum sativum</i> Lmk. <i>Zea Mays</i> L.	blé maïs	caryopses et plantules caryopses et plantules
Légumineuses	<i>Phaseolus vulgaris</i> L.	haricot var. Blanc d'Espa- gne	embryons

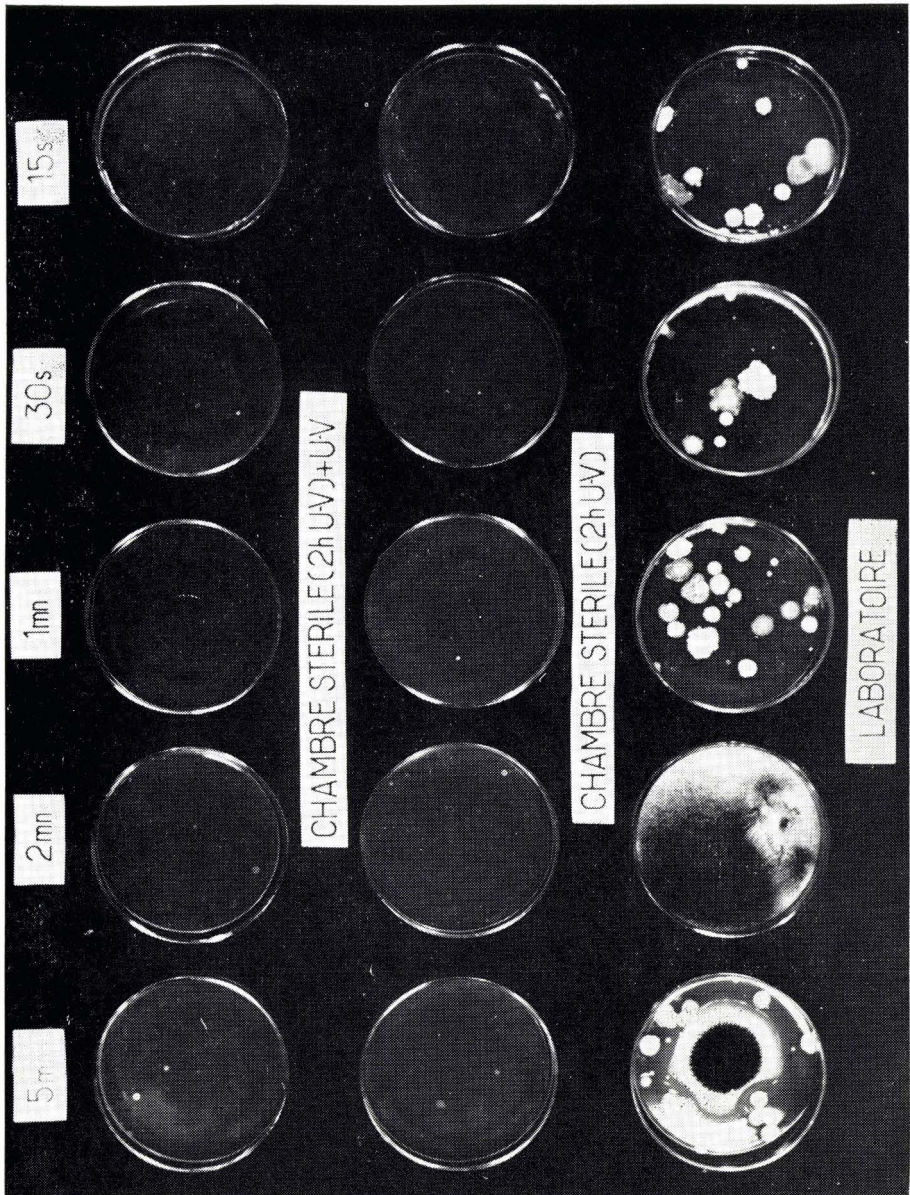
Tableau 3. — Végétaux et organes étudiés dans le mémoire.

3^o Stérilisation de la surface des organes :

Avant d'entreprendre l'isolement des bactéries intracellulaires, il est bien entendu indispensable de détruire au préalable toute la flore de la surface des organes. Pour y parvenir, nous avons opéré de diverses façons.

a) Nous immergeons les organes à étudier, préalablement lavés à l'eau, dans une solution aqueuse antiseptique. Nous avons essayé deux produits : le chlorure mercurique (ou sublimé corrosif) et l'hypochlorite de sodium à des concentrations et pendant des temps variables. Le tableau 4 p. 33 rend compte des résultats obtenus pour la stérilisation des caryopses de blé et de maïs.

A la suite de ces essais, nous avons retenu le chlorure mercurique, la concentration de 0,2 % et la durée de 1/2 h. Nous avons d'ailleurs pu remarquer, comme nous le montrerons ultérieurement, que le sublimé ne pénétrait que lentement dans les tissus. Ceci, dans le cadre de nos travaux, est un avantage incontestable.



Influence des rayons ultra-violet sur les conditions de travail. Les boîtes de Pétri renferment un milieu nutritif gélosé ; elles sont ouvertes dans différentes conditions pendant les temps indiqués en haut de la planche.

b) Nous avons recours également, notamment pour les prélèvements dans les organes charnus, à la stérilisation par trempage dans l'alcool et flambage ou par passage prolongé de la surface de l'organe dans la flamme d'un bec Bunsen.

Le plus fréquemment, ce second procédé est appliqué sur des organes déjà stérilisés par la solution antiseptique.

	Nature de l'antiseptique	Durée du traitement en mn	Concentration de l'antiseptique en %	Stérilité (1) en %
BLÉ	Chlorure mercurique .	30	0,05	75
		—	0,1	94,7
		—	0,2	100
	Hypochlorite de sodium.	60	0,05	94,7
		—	0,1	100
		—	0,2	100
MAÏS	Chlorure mercurique . .	30	0,05	70
		—	0,1	100
		—	0,2	100
	Hypochlorite de sodium.	60	0,05	85
		—	0,1	100
		—	0,2	100
	Hypochlorite de sodium.	30	0,3	70
		60	—	70
		120	—	100

Tableau 4. — Efficacité comparée de deux antiseptiques pour la stérilisation des caryopses de blé et de maïs.

4° Le milieu de base :

Nous avons toujours utilisé, pour lesensemencements primaires, le même milieu de culture. Il comprend (A. 5) :

Extrait de viande (oxoïd)	10 g
Peptone (oxoïd)	10 g
Chlorure de sodium	5 g
Glucose	20 g
Eau distillée	1.000 ml

Ce milieu, réparti dans les différents récipients, est stérilisé à l'autoclave (115° C pendant 20 mn).

Les cultures sont incubées à l'étuve bactériologique réglée à 35°-37° C.

(1) % de grains qui, plongés dans un milieu nutritif n'y déterminent pas de prolifération bactérienne.

II. — PRÉLÈVEMENT ET ISOLEMENT DES BACTÉRIES A PARTIR DES VÉGÉTAUX

Bien entendu ces méthodes sont différentes selon que les organes sont tubérisés et charnus ou petits et déshydratés (graines, embryons).

1° Prélèvement dans des organes charnus :

La surface est stérilisée par immersion de l'organe entier dans le sublimé (0,2 % - 20 mn) puis par passage dans l'alcool immédiatement suivi d'un flambage au bec Bunsen. Il y a alors deux possibilités : ou bien laisser l'organe entier et prélever en traversant les tissus périphériques, ou bien le sectionner transversalement si l'on désire atteindre avec précision des zones plus internes. Quoi qu'il en soit on chauffe davantage, presque jusqu'à carbonisation, l'endroit où l'on fait immédiatement pénétrer un emporte-pièce ou trocart. On obtient de cette façon un fragment ou explantat (d'environ 30 mm de longueur et 5 mm de diamètre) qui, poussé en dehors de l'outil, est directement introduit dans un tube à essais (20 × 200 mm) contenant 20 ml de milieu de base stérilisé.

Évidemment, est-il nécessaire de le préciser, tous les instruments sont stérilisés avant l'emploi et toutes les manipulations conduites rapidement près de la flamme selon les méthodes bactériologiques habituelles.

La blessure provoquée par la pénétration du trocart est suffisante, sans qu'il soit besoin de broyer, pour libérer, dans certains cas, les micro-organismes qui se trouvaient dans les cellules ouvertes par l'outil.

2° Isolement à partir des petits organes :

Les caryopses, stérilisés par le sublimé sont introduits dans des ampoules de 30 ml du microbroyeur de Durel et Sausse ; elles contiennent chacune 10 ml environ du milieu de culture de base. Une incubation de 48 h permet d'éliminer éventuellement les ampoules dont le contenu pollué indique une stérilisation imparfaite de la surface des grains.

Les tubes dont le milieu nutritif est resté stérile après contrôle, sont passés au microbroyeur à couteaux rotatifs. Des ampoules témoins, ne renfermant que le bouillon de culture sont soumises au même traitement afin de vérifier la stérilité du broyage. Celle-ci s'est révélée parfaite.

Les manipulations sont identiques pour les embryons de haricot prélevés dans les graines à l'aide d'un scalpel.

3° Isolement des différentes espèces bactériennes :

Le trocart ou les couteaux du broyeur, en détruisant les parois des cellules, libèrent, dans certains cas des micro-organismes qui se multiplient activement dans le milieu. Il convient d'isoler rapidement les différentes espèces.

La méthode est classique, nous l'exposerons brièvement ; elle comprend :

— prélèvement à l'aide d'une pipette Pasteur d'un ml de milieu.

— dilution à raison d'une goutte pour 10 ml d'eau distillée stérile.

— étalement en stries parallèles d'une goutte de ce liquide à la surface du milieu de base gélosé à 1,5 % et coulé en boîtes de Pétri.

— après 48 h environ d'incubation à l'étuve, les colonies bactériennes se sont développées le long des stries d'ensemencement. Chaque espèce présente des caractères particuliers (taille, forme, coloration et contours des colonies) qui permettent de les différencier les unes des autres.

Nous choisissons, dans chaque cas, une colonie isolée qui, prélevée à l'aide de l'ensemencement à fil de platine et diluée dans de l'eau stérile, est soumise à un nouvel ensemencement identique à celui que nous venons de décrire. Cette opération a pour but de contrôler la pureté de chaque espèce et éventuellement de continuer l'isolement : les bactéries muqueuses sont en particulier difficiles à obtenir sans mélange et nécessitent plusieurs purifications.

Lorsque, sur toute la surface d'une boîte de Pétri, on ne voit qu'un seul type de colonie, l'espèce est considérée comme isolée : elle est alors repiquée en tube incliné sur le milieu de base gélosé et entretenue régulièrement par repiquage tous les deux mois environ.

4^o Nombre d'échantillons examinés :

Nous avons examiné pour chaque végétal un certain nombre d'individus :

— plus de 200 pour les tubercules de pomme de terre.

— environ 20 pour tous les végétaux dont les prélèvements ont eu lieu dans les racines tubérisées (carotte, betterave etc...).

Nous avons pris, en moyenne 6 explantats par organe charnu ce qui a conduit à un nombre très important d'expériences d'isolement (500 environ).

Quant aux caryopses et embryons, nous en avons parfois placés plusieurs par ampoule de broyage et les souches obtenues proviennent de l'étude d'environ 400 caryopses de blé et de maïs et 500 embryons de haricot.

Nous avons pu de cette façon constituer une collection de 30 souches bactériennes issues d'organes végétaux : elle nous sert de point de départ pour les travaux de détermination.

III. — MÉTHODES DE DÉTERMINATION DES BACTÉRIES

Outre l'observation microscopique des cultures, la détermination des bactéries repose sur des examens microscopiques et surtout sur les critères physiologiques de comportement dans des milieux de culture très variés. C'est l'ensemble de ces données qui permet d'aboutir aux caractérisations.

Nous avons, pour éviter de surcharger ce texte, reporté, en annexe, à la fin du mémoire, toutes les indications pratiques et les formules pour la préparation des milieux et réactifs (1).

1° Techniques d'observation microscopique :

C'est par la coloration de Gram (A. 2) que commence toute détermination : nous avons utilisé la méthode de LASSEUR, DUPAIX et MAGUITOT (1931) préconisée par BUTIAUX, BEERENS et TACQUET (1963) sur des étalements provenant de cultures jeunes (48 h environ).

L'observation des spores est très importante : elle peut être effectuée sur des préparations colorées au Gram mais nous avons parfois eu recours à la méthode de TRUJILLO (A. 3). On distingue, suivant leur position dans le bacille des spores centrales, subterminales ou terminales. Selon qu'elles déforment ou non le corps bactérien les spores sont dites déformantes ou non déformantes.

La mise en évidence de la capsule est conduite selon la technique de BURRI (A. 4) à l'encre de Chine.

2° Caractères macroscopiques :

Pour les étudier nous avons utilisé 3 milieux différents :

a) *bouillon nutritif* (A. 5) : il permet de déterminer un certain nombre de caractères (trouble, voile, collerette, dépôt).

b) *gélose nutritive en surface* (A. 6) l'ensemencement en stries sur ce milieu coulé en boîtes de Pétri donne des indications sur la morphologie et la pigmentation des colonies.

On distingue rappelons-le :

— colonies circulaires à contours nets

+ type M (= mucous) : muqueuses, quelquefois très épaisses, brillantes, elles finissent par couler en s'étalant sur le milieu de culture.

+ type S (= smooth) : lisses, en général circulaires, convexes. Elles présentent parfois des stries rayonnantes ou circulaires mais ne s'étalent jamais.

— colonies de contours irréguliers

+ type R (= rough) : rugueuses, plates, à surface plissée et tourmentée.

c) *tranche de pomme de terre* (A. 7) : les bactéries sont ensemencées en stries sur des tranches de pomme de terre stérilisées en boîtes de Pétri. La morphologie, la pigmentation, l'odeur sont souvent caractéristiques.

3° Caractères biochimiques :

Les bactéries ont la possibilité, grâce à des systèmes enzymatiques très divers et complexes, de dégrader ou de synthétiser un grand nombre

(1) Elles sont classées en annexe (p. 135) dans l'ordre de leur citation. Les renvois dans le texte comportent un numéro d'ordre précédé de la lettre A (annexe).

de substances. Toutes les espèces n'ont pas, à cet égard, les mêmes capacités et c'est pourquoi l'étude des caractères biochimiques tient une place si grande dans la détermination.

Les différents tests de caractérisation peuvent se ranger en trois catégories.

A. — ACTION SUR LES HYDRATES DE CARBONE.

La fermentation des glucides est une propriété très répandue chez les bactéries : un certain nombre d'entre elles sont susceptibles de dégrader très fortement le glucose jusqu'au stade acétyl-méthyl-carbinol (A.M.C. ou acétoïne). Nous avons effectué cette recherche suivant la technique de BEERENS et GUILLAUME (1953) (A. 8).

Il est indispensable aussi, pour orienter les déterminations de connaître l'action de chaque espèce sur un certain nombre de sucres. Les plus intéressants sont : le glucose, le xylose et l'arabinose ; viennent ensuite le saccharose, le lactose et le mannitol. L'addition d'un indicateur coloré à la culture permet de déceler la production d'acide consécutive à la fermentation d'un sucre donné. La composition du milieu diffère selon qu'il s'agit de bactéries Gram positif sporulées (A. 9a) ou Gram négatif non sporulées (A. 9b). Il est nécessaire également de savoir si l'utilisation de ces sucres est accompagnée ou non d'une production de gaz (A. 10).

La culture sur gel d'amidon (A. 11) permet d'étudier le pouvoir amylolytique des souches.

Enfin, certaines bactéries sont capables d'utiliser le citrate de sodium comme seule source de carbone. Cela est évidemment un critère de classification intéressant : il est étudié grâce au milieu de Simmons (A. 12) qu'il faut soigneusement préparer en dehors de toute trace de carbone organique.

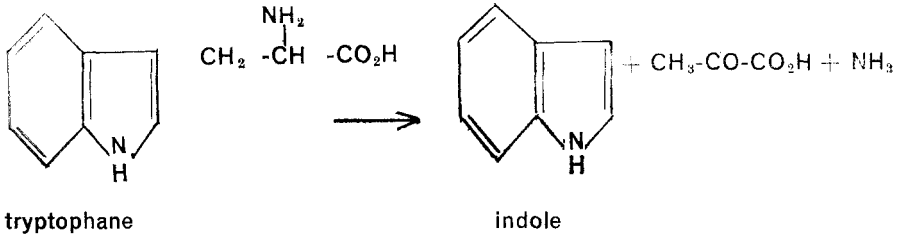
B. — ACTION SUR LES COMPOSÉS AZOTÉS :

Parmi les composés azotés on distingue d'une part des substances simples (urée, glutamine, asparagine) qui peuvent être directement fermentées par les micro-organismes et, d'autre part des produits beaucoup plus complexes (protéines, polypeptides, acides nucléiques, nucléotides etc...) qui sont décomposés par de nombreux enzymes hydrolysants, d'origine bactérienne, avant d'être utilisés.

Toutes ces réactions de dégradation sont très importantes pour l'étude des métabolismes, seules quelques unes ont un intérêt pour la classification.

L'urée entre dans la composition du milieu de Christensen (A. 13) : elle est transformée par certaines souches en carbonate d'ammonium en entraînant une alcalinisation du milieu.

La peptone pancréatique contient du tryptophane libre dont la destruction par divers micro-organismes conduit à l'indole. Ce produit est mis en évidence dans les cultures par le réactif de Salkowsky (A. 14).



C'est également à partir d'un milieu peptoné additionné ou non de nitrate (A. 15) qu'est éprouvée la formation de nitrites.

Pour parvenir à caractériser les espèces bactériennes on s'adresse encore à trois substances azotées complexes d'origine animale : la gélatine, le lait et la lécithine. Les deux premières sont d'un emploi très général car un grand nombre de bactéries y prolifèrent de façon caractéristique. La troisième est beaucoup plus particulière : elle n'est spécifique que de peu d'espèces.

C'est à l'élaboration d'une gélatinase au sein du milieu gélatiné (A. 16) qu'est due la liquéfaction : elle se produit de diverses façons et à des vitesses variables.

Les modifications du milieu de culture qui suivent l'ensemencement dans le lait (A. 17) sont de deux ordres : celles qui découlent d'une action sur le lactose (hydrolyse et libération d'acide) et celles qui, lorsque la coagulation de la caséine a eu lieu, résultent de l'apparition éventuelle d'un enzyme protéolytique digérant le caillot.

La recherche de la production de lécithinase, indispensable pour la détermination de certains *Bacillus*, est réalisée sur un milieu particulier (A. 18) à base de jaune d'œuf.

Pour être complète, la série de caractérisations physiologiques doit se poursuivre par l'étude du type respiratoire de la souche. Pour cela on ensemence un milieu gélosé encore liquide (A. 19) coulé en tubes profonds.

Après incubation on conclut qu'une espèce est aérobie si elle se développe uniquement en surface, anaérobie si elle prolifère seulement dans la partie profonde du milieu, aérobie-anaérobie facultative lorsque la culture s'étend à toute la hauteur de la colonne d'agar.

Enfin, on détermine, également dans un milieu nutritif faiblement gélosé coulé en tubes étroits (A. 20), le caractère de mobilité de l'espèce considérée ; on observe pour cela la progression éventuelle de la culture à partir d'un ensemencement en piqûre centrale verticale.

Les tests biochimiques que nous venons d'indiquer sont d'un emploi très général en bactériologie, cependant, pour la détermination d'un certain nombre d'espèces, notamment les Gram négatifs, il faut recourir à divers milieux de culture très particuliers.

Il faut préciser, pour les germes Gram négatifs qui fermentent le glucose, si la production d'acide est suffisante pour faire virer le rouge de méthyle (pH 4,5), (A. 21).

La culture dans un milieu contenant du sulfate ferreux permet d'étudier la possibilité de réduction de ce sel en H₂S (A. 22) effectuée entre autres par certaines espèces du genre *Proteus*. Celui-ci est par ailleurs très bien caractérisé par sa capacité de transformer la phénylalanine en acide phényl-pyruvique (A. 23).

La résistance de certaines espèces bactériennes au cyanure de potassium peut également être éprouvée (A. 24) ainsi que la décarboxylation éventuelle de divers acides aminés ajoutés au milieu (A. 25) : la lysine se transforme en cadavérine, l'ornithine en putrescine (*Proteus vulgaris*).

Il est souvent utile d'établir l'existence ou l'absence, pour un germe donné d'un système d'oxydo-réduction : on recherche notamment l'oxydase et la cytochrome-oxydase selon une technique simple (A. 26) au chlorhydrate de tétra-méthyl-para-phénylène-diamine.

On prépare également un milieu spécial pour déceler (A. 27) si un hydrate de carbone (souvent le glucose) est dégradé par oxydation ou par fermentation : on distingue sur ce plan les germes oxydants, inertes, alcalinisants et fermentants.

Enfin, lorsque la bactérie élabore un pigment, on cherche à en exalter la production sur un milieu spécial (A. 28).

Nous avons résumé les caractères distinctifs de toutes les espèces déterminées ou non et, pour faciliter les comparaisons, nous les présentons, sous forme de tableaux, dans les pages qui suivent :

		CARACTERES	
		microscopiques et macroscopiques	biochimiques
Sporulées Gram +	Spores non renflées Groupe I	Tabl. 7, p. 42	Tabl. 6, p. 41
	Spores renflées Groupe II et III	Tabl. 8 et 9, p. 44	Tabl. 10 et 11, p. 46
Asporulées Gram --		Tabl. 13, p. 48	Tabl. 12 et 14, p. 47 et 50

Enfin le *tableau* 15, p. 51 donne la répartition de chaque espèce dans les végétaux que nous avons étudiés.

IV. — RÉSULTATS DES DÉTERMINATIONS

Les 30 souches qui résultaient de nos travaux d'isolement ont été étudiées comme nous venons de l'indiquer.

Le tableau ci-dessous donne les noms des 18 espèces déterminées et la position systématique des 12 espèces non déterminées.

CLASSES ORDRES Familles	Genres et espèces
ASPORULALES MICROCOCCALES Micrococcaceæ BACTERIALES Pseudomonaceæ Enterobacteriaceæ Non déterminées :	<i>Sarcina</i> <i>Pseudomonas fluorescens</i> <i>Pseudomonas sp. (1) non pigmenté</i> <i>Pseudomonas sp. (2) non pigmenté</i> <i>Achromobacter sp.</i> <i>Flavobacterium sp.</i> <i>Aerobacter cloacæ</i> <i>Klebsiella aerogenes</i> <i>Proteus rettgeri</i> <i>Paracoli aerogenoides</i> 3
SPORULALES BACILLALES Bacillaceæ Non déterminées :	<i>Bacillus cereus</i> <i>B. licheniformis</i> <i>B. megaterium</i> <i>B. subtilis</i> <i>B. sphaericus</i> <i>B. coagulans</i> <i>B. polymyxa</i> <i>B. pumilus</i> 9

Tableau 5. — *Les bactéries isolées : leur place dans la classification.*

Tableau 6 Caractères biochimiques	BACILLES GRAM + Groupe I : Spores centrales ou subterminales non renflées												
	Genres et espèces	A.M.C.	Glucose	Arabinose	Xylose	Amidon	Citrate	Urée	Nitrates	Gélatine	Caséine	Lécithinase	Anaérobiose
<i>Bacillus subtilis</i>	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+
<i>B. licheniformis</i>	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+
<i>B. pumilus</i>	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	-	-	+
<i>B. cereus</i>	+	+	-	-	+	-	-	+	+	+	++	+	±
<i>B. megaterium</i>	-	+	±	±	+	±	-	-	+	+	-	-	+
<i>B. coagulans</i>	+	+	±	±	+	-	-	-	-	-	-	+	±
L. 5	+	+	-	-	+	-	-	+	+	-	-	+	-
L. 9	+	-	-	-	+	-	-	+	+	+	-	+	+
B. E.	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+
B. F.	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+
B. J.	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+	-

Tableau 7
Caractères micro et macroscopiques

BACILLES
Groupe I : Spores centrales ou

Genres et espèces	Dimen- sions en μ	Spores en μ C = Centrale	Bouillon nutritif			
			Voile	Trouble	Dépôt	Colle- rette
<i>Bacillus subtilis</i>	2 - 3 0,7 - 0,8	C 1 - 1,5 0,6 - 0,9	++ épais plissé cireux	—		+
<i>B. licheniformis</i> (1)	1,5 - 3 0,6 - 0,8	C 1 - 1,5 0,6 - 0,9	++ épais plissé	—		—
<i>B. pumilus</i>	2 - 3 0,6 - 0,7	C 1 0,5	±	+	(±)	+
<i>B. cereus</i> (1)	3 - 5 1 - 1,2	C 1,5 1	+ léger grumeleux au début	+	(±)	+
<i>B. megaterium</i> (1)	2 - 4 1,2 - 1,5	C ovoïde 1,5 - 2 1 - 1,2	—	+	(±) floconneux	—
<i>B. coagulans</i>	2,5 - 5 0,6 - 1	Subter. 1,2 - 1,5 0,9 - 1	+ uni et fin	+ jaunâtre	++ épais	+
L. 5	2 - 2,5 0,5 - 0,7	C ovoïde 0,8	+ léger uni	+ léger	—	—
L. 9	3,5 - 5 1 - 1,5	C 1,5 0,6	+ grumeleux	—	+	—
B.E.	4 - 5 1 - 1,5	C ronde 1,5	+ fin	+ léger		+
B.F.	2 - 3 0,6 - 1	C	+ léger	+		+
B.J.	2 - 4 0,7 - 1	C	—	+ léger		

(1) Illustrations à la planche II.

GRAM +
subterminales non renflées

Gélose en surface

Culture
sur tranche de pomme de terre

Colonies blanchâtres, opaques, ternes, rugueuses, très extensives. Peu d'adhérence.

Développement très rapide : enduit blanchâtre épais, extensif. Surface granuleuse.

Grandes colonies, roses, rugueuses. Brunissent en vieillissant. Excroissances filiformes. Forte adhérence.

Enduit rose épais, plissé. Parfois petites vésicules. La tranche devient rouge.

Colonies circulaires bombées, légèrement brunâtres. Surface lisse et luisante.

Croissance assez rapide. Enduit épais, brunâtre. Le milieu noircit en vieillissant.

Grandes colonies blanchâtres, rugueuses, parfois irrégulières et contours arborescents. Plats au début elles s'épaississent ensuite.

Développement très rapide. Enduit épais, blanc crémeux, très tourmenté.

Grandes colonies luisantes, humides, convexes, blanc à jaunâtre.

Se développe bien. Enduit lisse, filant, brillant, extensif, jaune-crème à jaune-orangé.

Colonies petites, circulaires, grisâtres, bombées, opaques, stries rayonnantes.

Croissance très faible.

Grandes colonies (10 mm et +) très plates, grisâtres, ternes, contours irréguliers. Plis en surface au centre. Pas d'adhérence.

Développement abondant, enduit gris à nombreux replis très enchevêtrés.

Colonies de 7 à 15 mm très plates, centre roux s'éclaircissant vers la périphérie. Aspect rugueux. Contours très irréguliers.

Enduit sinueux, épais, grisâtre à marron. Nombreux replis.

Petites colonies circulaires mates, blanchâtres se développant très peu. Contours un peu festonnés. Adhérence faible.

Enduit blanchâtre brunissant ensuite. Assez peu extensif.

Colonies très visqueuses, circulaires ou ovales, contours nets, surface lisse. Peu d'adhérence.

Enduit visqueux gluant, blanchâtre très extensif.

Petites colonies très plates, translucides, bords festonnés. Adhérence légère.

Enduit peu épais, assez extensif, coloration jaune-orangé très caractéristique.

Tableau 8 Caractères micro et macroscopiques			BACILLES Groupe II : Spores centrales ou			
Genre et espèces	Dimen- sions en μ	Spores en μ	Bouillon nutritif			
			Voile	Trouble	Dépôt	Colle- rette
<i>Bacillus polymyxa</i>	2,5 - 6 0,6 - 1	1,2 - 1,5 1,5 - 2,5 nom- breuses. Ellipsoïdes	±	+	+ visqueux	—

Tableau 9 Caractères micro et macroscopiques			BACILLES Groupe III : Spores terminales			
Genres et espèces	Dimen- sions en μ	Spores en μ	Bouillon nutritif			
			Voile	Trouble	Dépôt	Colle- rette
<i>Bacillus sphaericus</i>	1 - 5 0,6 - 2 bouts ronds	1,2 0,7 rondes	—	+	+	—
L. 11	3 - 6 0,7 - 1		+ léger	++		—
L. 19	2 - 4 0,8 - 1 souvent groupés		+ léger	+	+	—
L. 20	3 - 6 1 - 1,5		—	++	—	—
L. 22	3 - 6 0,6 - 0,8		+	+	—	—

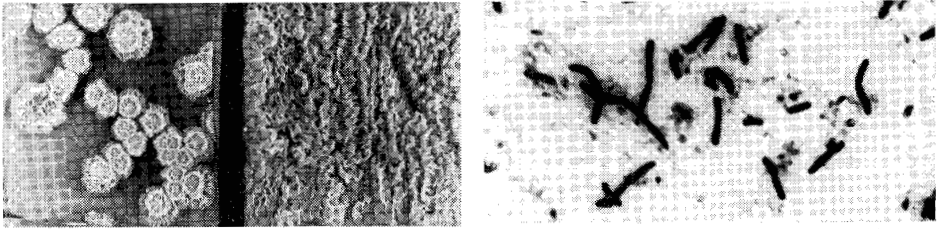
<p>GRAM + subterminales ovalaires renflées</p>	
<p>Gélose en surface</p>	<p>Culture sur tranche de pomme de terre</p>
<p>Colonies très petites, circulaires, plates, blanchâtres, rugueuses.</p>	<p>Croissance rapide. Désagrégation du milieu avec dégagement gazeux.</p>

<p>GRAM + renflées</p>	
<p>Gélose en surface</p>	<p>Culture sur tranche de pomme de terre</p>
<p>Colonies circulaires, assez petites, lisses, translucides. Pas d'adhérence.</p>	<p>Développement faible. Enduit très mince grisâtre.</p>
<p>Colonies très plates, rugueuses, contours peu nets, centre clair.</p>	<p>Enduit très abondant. Légère pigmentation marron, gros replis, très contournés.</p>
<p>Colonies variables (2 à 10 mm), blanches, plates, cernées d'un bourrelet. Légers plis. Prolongements filiformes dans le milieu.</p>	<p>Se développe bien, quelques replis.</p>
<p>Grandes colonies (10 mm et +), blanc-grisâtre, luisantes, humides. Contours nets. Puis gluantes et coulantes.</p>	<p>Développement très abondant. Enduit blanc en fin réseau enchevêtré.</p>
<p>Grandes colonies plates, circulaires. Plis rayonnants roses.</p>	<p>Développement extensif, luisant, humide, rose, surface très vésiculeuse.</p>

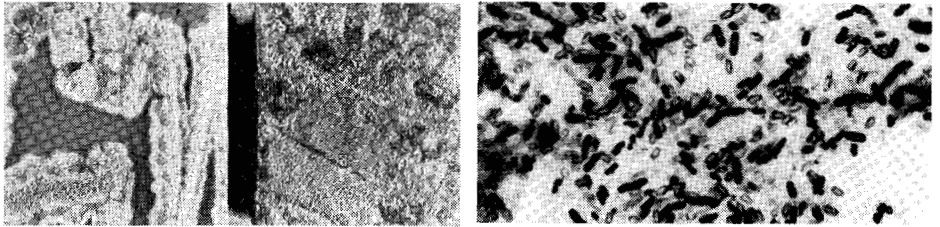
Tableau 10		BACILLES GRAM +											
Caractères biochimiques		Groupe II : Spores centrales ou subterminales ovales renflées											
Genre et espèces	A.M.C.	Glucose	Arabinose	Xylose	Amidon	Citrate	Urée	Nitrates	Gélatine	Caséine	Lécithinase	Anaérobiose	Saccharose
<i>Bacillus polymyxa</i> (= <i>Clostridium</i>)	+	+ Gaz	+ Gaz	+ Gaz	+	-	-	+	+	+	-	+	+

Tableau 11		BACILLES GRAM +											
Caractères biochimiques		Groupe III : Spores terminales renflées											
Genres et espèces	A.M.C.	Glucose	Arabinose	Xylose	Amidon	Citrate	Urée	Nitrates	Gélatine	Caséine	Lécithinase	Anaérobiose	Saccharose
<i>Bacillus sphaericus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L. 11	+	-	+	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-
L. 19	+	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-	+
L. 20	+	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-	+
L. 22	+	-	+ Gaz	+ Gaz	-	-	-	+	+	+	-	-	+

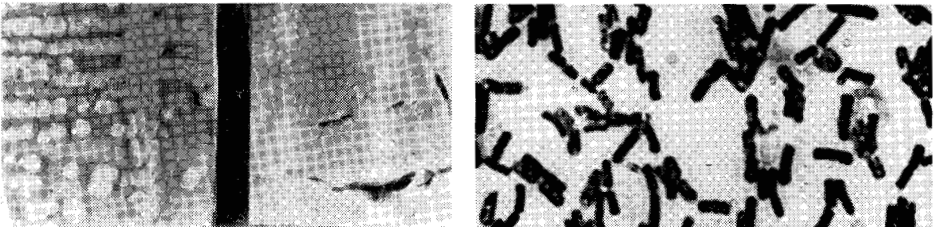
Planche II



Bacillus cereus



Bacillus licheniformis



Bacillus megaterium

Caractères micro et macroscopiques de trois *Bacillus*

A gauche : culture sur gélose nutritive.

Au milieu : culture sur tranches de pomme de terre.

A droite : microphotographie (G = 2.000) après coloration de Gram.

Pour la détermination des Asporuriales Gram —, nous avons suivi les techniques de BUTTIAUX, BEERENS et TACQUET (1962).

Les Enterobacteriaceæ sont :

- Gram —
- mobiles ou immobiles
- fermentent le glucose avec gaz
- Lactose +
- Mannitol +

Les Pseudomonaceæ sont :

- Gram —
- mobiles ou immobiles
- Lactose —
- Mannitol —

Le *tableau* 12, permet d'une part de différencier les 3 genres de Pseudomonaceæ isolés et d'autre part de les distinguer des Enterobacteriaceæ.

	PSEUDOMONACEÆ			ENTERO- BACTE- RIACEÆ
	<i>Pseudo- monas</i>	<i>Achromo- bacter</i>	<i>Flavo- bacterium</i>	
Mobilité	+	—	—	+ ou —
Lactose	—	—	—	+ ou —
Glucose	± G —	—		+ G ±
Mannitol	—	—	—	+
Milieu sucré (A9 b)	Ox ou In ou Al	Al	Ox	F
Oxydase	+	+ ou —	+	—
Système respiratoire	A	A	A	A. An

Tableau 12. — Différenciation des genres de Pseudomonaceæ ; différence avec les Enterobacteriaceæ.

Ox = Oxydant. In = Inerte. Al = Alcalinisant. G = Gaz.
A = Aérobie strict. A-An = Aérobie-anaérobie facultatif.

Parmi les Enterobacteriaceæ le genre *Proteus* se distingue par la désamination de la plupart des acides aminés L en acides α -cétoniques correspondants ; ainsi la phényl-alanine est rapidement transformée en acide phényl-pyruvique.

Proteus rettgeri a été déterminé grâce à l'obligeance des services de l'Institut Pasteur de Lille.

Les autres genres : *Klebsiella*, *Paracoli* et *Aerobacter* sont différenciés selon les caractères du *tableau* 14, p. 50.

Tableau 13
Caractères micro et macroscopiques

BACILLES

	Genres et espèces	Dimen- sions en μ	Bouillon nutritif			
			Voile	Trouble	Dépôt	Colle- rette
PSEUDOMONACEÆ	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	1,5 0,5 - 0,6	+ épais uni	+ pigment. rouille	+	+
	<i>Pseudomonas sp. 1</i>	3 - 5 0,7 - 1	0	+ jaune	+	+ jaune
	<i>Pseudomonas sp. 2</i>	1,5 0,6 - 0,8	0	++		0
	<i>Achromobacter sp.</i>	1 - 6 0,8 - 1	0	+		
	<i>Flavobacterium sp.</i>	2,5 - 3,5 0,7	+ jaunâtre	+		+
ENTEROBACTERIACEÆ	<i>Aerobacter cloacæ</i> (= <i>Cloaca</i>)		++ épais	+ laiteux	+ visqueux	+
	<i>Klebsiella aerogenes</i>	coccobac. 1,5 1	0	++ jaune	++ muqueux	+ jaune
	<i>Proteus rettgeri</i>		+	+	+	+
	<i>Paracoli aerogenoïdes</i>		+ léger	+ léger	+ léger	+ légère
L. 12	1,5 - 2,5 0,5 - 0,8 groupés	+ léger	++	+	+	
L. 15	2 - 4 1 - 1,5	++ épais filant jaune	+ jaune	+	0	
L. 21	2 - 3 0,6 - 1 isolé ou par paires	++ uni	+ léger		0	

GRAM —

Gélose en surface	Culture sur tranche de pomme de terre
Colonies de grandes tailles. Extensives. Centre foncé (rouge ou verdâtre). Bords clairs (rose-roux). Pigment brun, diffuse dans le milieu.	Culture abondante, brun-clair, puis foncé.
Colonies circulaires, petites, plates, luisantes, translucides, jaune-pâle.	Enduit peu extensif, marron-clair. luisant, humide.
Colonies circulaires 5 à 10 mm, épaisses, convexes, luisantes, humides. Centre plus foncé.	Enduit luisant, humide, brun-chocolat, légèrement extensif.
Petites colonies circulaires, lisses, fines, translucides, pas d'adhérence.	Développement très faible. Fine pellicule devenant grisâtre.
Colonies circulaires, lisses, convexes, au départ blanches puis jaunes.	Développement faible, enduit humide, brillant, jaune-foncé.
Colonies moyennes, circulaires, épaisses, blanches, filantes, luisantes.	Colonies peu extensives, blanc-jaunâtre, luisantes, coulant un peu.
Colonies moyennes, luisantes, blanches, épaisses, convexes, lisses. Pigment brun qui diffuse dans la gélose.	Colonies peu extensives, blanches parfois jaunâtres, épaisses, visqueuses.
Colonies de 1 à 5 mm, blanches, luisantes, type smooth, auréoles concentriques, parfois tendance à l'étalement.	Croissance assez rapide. Colonies blanches, luisantes, épaisses.
Colonies de 2 à 5 mm, blanches, épaisses, centre plus foncé, luisantes. Les colonies semblent entourées d'un bourrelet.	Colonies étalées, très plates, grisâtres à jaunâtres avec de légers plis.
Colonies moyennes blanches, luisantes, humides, s'étalant fortement après 48 h.	Colonies blanches, luisantes, humides.
Colonies se développant mal, petites, circulaires, légèrement convexes, luisantes, blanc-jaunâtre, contours nets.	Développement faible le long des stries d'ensemencement. Colonies luisantes, pigment marron.
Petites colonies circulaires, à contours nets, luisantes, centre plus jaune que le pourtour.	Développement très faible. Jaune très pâle.

	<i>Klebsiella</i>	<i>Paracoli aero- genoides</i>	<i>Aero- bacter</i>	<i>Proteus</i>
Mobilité	—	+	+	+ lent
Lactose	+	+	+	—
Uréase	+	—	—	+
Acide phényl-pyruvique	—	—	—	+
Lysine (décarboxylase)	+	+	—	
Arginine (dihydrolase)	—	—	+	
Ornithine (décarboxylase)	—	+	+	

Tableau 14. — Détermination des genres dans la famille des *Enterobacteriaceæ*.

Les seuls cocci qui faisaient partie de nos isolements appartiennent au genre *Sarcina*. Ils ont 1 à 2 μ de diamètre et sont réunis en groupes réguliers. Dans l'eau peptonée glucosée il se forme un dépôt très important au fond du tube de culture ; il n'y a pas de voile. Sur gélose les colonies sont petites, blanches, opaques, circulaires ; elles doivent être fréquemment repiquées. Sur pomme de terre la prolifération presque nulle est limitée aux stries d'ensemencement.

L'examen du tableau de répartition (p. 51) permet de faire quelques remarques.

1° Tous les végétaux étudiés, quel que soit l'organe considéré, hébergent des bactéries : aucun ne fait exception.

Certes le nombre des espèces isolées varie selon les plantes hôtes (tableau 16 p. 52).

2° *Bacillus cereus* et *B. licheniformis* qui figurent dans le haut du tableau sont présents ensemble dans tous les cas.

3° 4 espèces se retrouvent dans 4 végétaux différents : *Bacillus coagulans*, L. 5, *Flavobacterium sp.*, *Proteus rettgeri*.

6 espèces se retrouvent dans 3 végétaux différents : *Bacillus megaterium* (1), *B. pumilus*, L. 9, *Pseudomonas sp.*, *Aerobacter cloaca*, *Sarcina*.

(1) La présence de ce *Bacillus* dans les tubercules de pomme de terre avait déjà été signalée (LUTMAN et WHEELER, 1948).

Végétaux étudiés		Organes tubérisés							Caryop- ses		Em- bryon	
		Pomme de terre	Betterave	Carotte	Chicorée	Topinambour	Céleri	Choux-navet	Radis noir	Blé	Mais	Haricot
Espèces bact. isolées												
SPORULALES GRAM +	<i>Bacillus subtilis</i>	+										
	<i>B. licheniformis</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	<i>B. pumilus</i>	+								+	+	
	<i>B. cereus</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	<i>B. megaterium</i>	+		+				+				
	<i>B. coagulans</i>	+								+	+	+
	L. 5			+	+		+					+
	L. 9								+		+	+
	B. E.	+										
	B. F.	+										
	B. J.	+										
	<i>Bacillus polymyxa</i>	+										
	<i>B. sphaericus</i>	+										
	L. 11			+			+					
	L. 19										+	
	L. 20								+			
L. 22							+					
ASPORULALES GRAM —	<i>Pseudomonas</i> non pig. 1		+	+				+				
	<i>Pseudomonas</i> non pig. 2							+				
	<i>Pseudomonas</i> pig.							+				
	<i>Flavobacterium</i> sp.				+	+	+	+				
	<i>Achromobacter</i> sp.	+									+	
	<i>Aerobacter cloaca</i>				+		+		+			
	<i>Klebsiella aerogenes</i>				+							
	<i>Proteus rettgeri</i>		+		+	+			+			
	<i>Paracoli aerogenoides</i>			+		+						
<i>Sarcina</i>	+								+	+		

Tableau 15. — Répartition des espèces bactériennes isolées dans les végétaux étudiés.

Végétal	Nombre d'esp. bact. isolées
Pomme de terre	13
Maïs (caryopses)	10
Choux-navet	9
Carotte	8
Chicorée	7
Radis noir	7
Céleri	6
Haricot (embryons)	5
Blé (caryopses)	5
Betterave	5

Tableau 16. — Nombre d'espèces isolées pour chaque végétal.

4 espèces se retrouvent dans 2 végétaux différents : *Bacillus subtilis*, L. 11, *Achromobacter*, *Paracoli aerogenoides*.

11 espèces enfin n'ont été trouvées que chez un seul végétal : *Bacillus polymyxa*, *B. sphaericus*, *B. E.*, *B. F.*, *B. J.*, L. 19, L. 20, L. 22, *Pseudomonas* non pigmenté, *Pseudomonas* pigmenté, *Klebsiella aerogenes*.

4° Les *Bacillus* Gram positif sont les espèces les plus fréquemment isolées. Ils sont particulièrement bien représentés dans les tubercules de pomme de terre (11 espèces).

5° Parmi les espèces isolées de la chicorée, 3 pourraient être fécales.

Ceci expliquerait certaines infections pathologiques consécutives à l'ingestion des feuilles crues de cette plante.

6° Du chou-navet nous avons pu isoler 3 espèces différentes de *Pseudomonas*.

7° Le genre *Rhizobium* est absent de nos isolements.

V. — FRÉQUENCE D'ISOLEMENT DE CHAQUE ESPÈCE BACTÉRIENNE

En donnant les résultats de nos déterminations nous nous sommes placés, jusqu'ici, sur un plan purement qualitatif.

Sous l'angle quantitatif, les fréquences d'isolement de chaque espèce bactérienne sont très différentes. Une souche peut se retrouver très souvent dans les analyses, une autre au contraire n'avoir été obtenue qu'un petit nombre de fois. En ce domaine nous ne disposons pas de renseignements chiffrés précis pour tous les végétaux étudiés mais seulement pour un certain nombre d'entre eux.

Les *tableaux* 17 et 18 donnent, par rapport à l'ensemble des souches hébergées par les caryopses de blé et de maïs, les pourcentages de fréquence de chaque espèce isolée.

Espèces isolées	% arrondis
<i>B. cereus</i>	55
<i>B. licheniformis</i>	25
<i>B. coagulans</i>	5
<i>B. pumilus</i>	5
<i>Sarcina</i>	5

Tableau 17. — *Caryopses de blé. Fréquence d'isolement de chaque espèce bactérienne.*

Espèces isolées	% arrondis
<i>B. pumilus</i>	35
<i>B. cereus</i>	34
<i>B. subtilis</i>	9
<i>Achromobacter</i>	6
<i>B. E.</i>	6
<i>B. licheniformis</i>	6
<i>Sarcina</i>	3
<i>B. coagulans</i>	3

Tableau 18. — *Caryopses de maïs. Fréquence d'isolement de chaque espèce bactérienne.*

On remarque que chez ces Graminées, le *Bacillus cereus* est toujours très fréquent. Le *B. pumilus* vient en première position chez le maïs alors qu'il ne représente que 5 % des isolements chez le blé.

En ce qui concerne la pomme de terre, une étude quantitative menée à partir de 324 tubercules dans lesquels ont été effectués 1.944 explantats, a conduit à 413 isolements positifs. Parmi ces derniers les techniques d'isolement bactériologique ont permis de distinguer 11 espèces différentes réparties en pourcentage selon les chiffres du *tableau* 19 p. 54.

Espèces isolées	%
<i>B. cereus</i>	46,7
<i>B. licheniformis</i>	13
B. F.	11
<i>B. subtilis</i>	8,7
<i>Achromobacter</i>	6,7
<i>Sarcina</i>	5,3
<i>B. coagulans</i>	4,7
B. J.	2,8
<i>B. polymyxa</i>	2,1
<i>B. pumilus</i>	1,4
<i>B. sphaericus</i>	0,7

Tableau 19. — *Tubercules de pomme de terre. Fréquence d'isolement de chaque espèce bactérienne (B. megaterium isolé au cours de travaux précédents ne figure pas dans ce tableau).*

CHAPITRE III

Observation des bactéries au sein des tissus Cytologie et travaux annexes.

Les méthodes bactériologiques que nous venons d'exposer ont permis de montrer l'existence de bactéries à l'intérieur des tissus normaux ; les examens cytologiques que nous avons menés dans le même temps ont conduit à l'observation de ces micro-organismes au sein des cellules. Cette entreprise était rendue très délicate par la grande ressemblance de forme entre les bactéries et les éléments du chondriome. On a vu précédemment comment PORTIER (1917), pris au piège des analogies morphologiques, en était arrivé à considérer que les chondriosomes représentaient des bactéries symbiotes obligatoirement présentes dans toute cellule.

Mais on a démontré, nous l'avons vu, que cette conception était insoutenable.

REGAUD (1919), a publié une mise au point très précise sur cette question, il dit notamment :

« Qu'il y ait des microbes vivant en symbiose avec des plantes et des animaux cela ne fait aucun doute. Que PORTIER ait vu de véritables microbes, non seulement inoffensifs mais bienfaisants dans les tissus normaux d'animaux divers : je ne mets pas cela en doute. Je m'en tiendrai à l'examen de cette question précise : les mitochondries sont-elles des microbes ?

» Les mitochondries ont une existence objective définitivement établie. On les voit aisément dans les cellules vivantes. Elles ont avec les microbes une analogie de forme que tous les observateurs ont remarquée mais qui n'est pas constante. Ce sont des corpuscules liquides ou tout au moins de consistance très molle, parfaitement limités mais d'une grande malléabilité. La manière dont leur substance se comporte vis-à-vis des acides, des sels métalliques, des solvants, a permis de leur

reconnaitre un support albuminoïde auquel sont unis des lipoides qu'on en dissocie avec une extrême facilité. Les mitochondries sont extraordinairement altérables : à un point tel que de petites variations du milieu intra-cellulaire ou du milieu ambiant (acide acétique très dilué des fixateurs habituels) altèrent très rapidement leur forme et les détruisent. Leur altérabilité par les fixateurs acides et la nécessité de les mordancer par certains sels métalliques domine entièrement la question de leur coloration De ce que, dans un tissu, voire dans une cellule, on constate la présence simultanée de mitochondries et de microbes on ne doit pas en conclure que les uns se transforment en les autres et inversement ».

MILOVIDOV (1928 a et b) a mis au point une technique de coloration permettant de colorer différemment au sein des cellules, les bactéries et le chondriome, nous l'avons utilisée.

I. — TECHNIQUES

1° Fixation :

Les fragments végétaux à étudier sont fixés dans le mélange de NEMEC :

Acide chromique à 1 %	50 parties
Bichromate de potassium à 1 %	50 —
Formol neutre	1 —

Le fixateur est préparé immédiatement avant l'emploi. On fixe à l'obscurité pendant quarante-huit heures mais on renouvelle le bain au bout de vingt-quatre heures.

Le lavage à l'eau courante doit être prolongé et durer au moins autant que la fixation, afin d'éliminer toute trace de chrome qui serait nuisible aux colorations.

La déshydratation et l'inclusion dans la paraffine sont conduites de façon classique (solvant : toluène).

Les coupes sont faites au microtome le plus souvent à l'épaisseur de 7,5 μ .

2° Coloration de Milovidov :

Après réhydratation la coloration est effectuée sur lame, elle comprend :

1° Coloration par la rubine acide à 20 % dans l'eau anilinée. Cette opération dure cinq minutes elle est effectuée sur la platine chauffante. Ne pas dépasser le stade de l'émission de vapeur et veiller à rajouter du colorant si besoin est.

2° Lavage à l'eau.

3° Différenciation à l'aurantia à 0,5 % dans l'alcool à 70°.

4° Lavage à l'eau.

5° Traitement par le mélange suivant :

— Acide phosphomolybdique	1 g
— Soude caustique normale	10 ml
— Eau distillée	90 -

6° Lavage à l'eau.

7° Coloration pendant dix à quinze minutes par :

— Violet de méthylène	0,4 g
— Azur II.	0,1 -
— Carbonate de potassium	0,1 -
— Eau distillée	50 ml
— Glycérine	50 -

ou par le bleu de Unna :

— Eau distillée	1 partie
— Glycérine	1 -
— Bleu de Unna	1 -

8° Lavage à l'eau.

9° Différenciation au tanin orange de Unna.

10° Lavage à l'eau.

11° Déshydratation par la série des alcools et montage au Xam.

Pour nos recherches, nous avons, sans constater de différence dans les résultats, diminué la concentration de la rubine acide (5 % au lieu de 20 %). Nous avons adopté le bleu de Unna qui donne, à notre avis, des teintes plus nuancées.

La proportion de colorant dans le mélange a été augmentée, il comporte :

— Eau distillée	1 partie
— Glycérine	1 -
— Bleu de Unna	2 parties

Les temps de coloration ont été eux aussi adaptés au matériel ; d'une manière générale, à titre d'indication, ils sont les suivants :

— Rubine	5 mn
— Aurantia	3 à 4 mn
— Mélange phospho-molybdique	3 mn
— Bleu de Unna	20 mn ou plus
— Tanin orange	de 2 à 4 mn

Les résultats dépendent un peu du matériel employé. On obtient généralement une teinte rouge pour les éléments du chondriome et bleu-vert pour les bactéries. Dans le noyau, la chromatine se colore en vert-bleu et les nucléoles en rouge. Les grains d'amidon sont bleus.

Les examens cytologiques n'ont pas porté sur tous les végétaux énumérés au chapitre précédent ; ils ont été consacrés essentiellement aux tubercules de pomme de terre et en second lieu aux racines tubérisées de betterave. Les jeunes plantules de blé et de maïs ont également, selon les mêmes techniques, fait l'objet de nos observations.

II. — ÉTUDE DES TUBERCULES DE POMME DE TERRE

1° Tubercules paraffinés :

Nous avons remarqué, au cours d'expériences préliminaires, qu'en recouvrant les tubercules d'une enveloppe de paraffine, le nombre de bactéries présentes dans les tissus au bout d'une semaine environ, avait tendance à augmenter (MONTUELLE, 1959). En effet, dans ce cas, en prélevant des explantats et en les plongeant dans un milieu de culture, les chances de voir s'y développer les bactéries étaient beaucoup plus grandes que si l'on opérait à partir de tubercules normaux. Nous avons d'ailleurs obtenu confirmation de cette façon de voir en observant des frottis de pulpe écrasée provenant de pomme de terre paraffinée et en y remarquant la présence de nombreuses bactéries (*pl.* III, 1 et 2).

Il pouvait donc être intéressant de commencer les examens cytologiques par du matériel ainsi traité.

Les tubercules sont stérilisés extérieurement (sublimé 0,2 % pendant une demi-heure, rinçage à l'alcool, flambage), ils sont ensuite passés dans un premier bain de paraffine bouillante puis plongés et retirés à plusieurs reprises dans un second bain à 55° C (température de fusion de la paraffine). Après refroidissement la pomme de terre est entourée d'une enveloppe l'isolant complètement de l'extérieur. On laisse passer huit jours puis on découpe dans le tubercule des fragments parallélépipédiques de tissus qui sont fixés, inclus coupés et colorés.

A l'observation on note, dans certaines cellules du parenchyme médullaire notamment, la présence de petits amas intensément bleus et constitués de petites granulations arrondies ou ovalaires noyées dans une substance bleu clair. La coloration, la forme, la taille de ces granulations, leur groupement en amas, que nous avons trouvés aussi bien dans les coupes histologiques que dans les frottis de pulpe écrasée (*pl.* III, 3 et 4), indiquent que ce sont des bactéries. Les colonies comprennent jusqu'à 20 cocco-bacilles environ ; on les rencontre assez rarement, leur situation dans la cellule est très variable, un certain nombre ont été observées à proximité des grains d'amidon. En aucun cas nous n'avons rencontré de zone où les cellules fussent toutes atteintes.

Nous avons également remarqué dans certaines cellules la présence de bâtonnets allongés et grêles parfois très nombreux. Ils sont colorés en rose ce qui, dans la méthode de coloration employée, pourrait faire penser à des chondriocotes. Cependant, si on observe des fragments du même matériel fixés par un mélange renfermant de l'acide acétique, ces bâtonnets sont toujours visibles : il ne peut donc s'agir de chondriome. Nous pensons que ces bâtonnets sont des bacilles qui, certainement à la faveur des conditions créées par le paraffinage des tubercules se

sont parfois abondamment multipliés. Nous avons pu observer la même cellule sur des coupes sériées voisines et constater qu'elle était à différents niveaux très riche en bacilles. Toutes les cellules, il s'en faut de beaucoup, ne renferment pas de bacilles : celles qui en possèdent semblent être localisées surtout au voisinage des zones conductrices. Ces micro-organismes sont intracellulaires ; il est très rare d'en rencontrer dans les méats.

Dans les tissus périphériques il y a moins de cellules atteintes (très approximativement 9 %). Les bacilles présentent alors fréquemment une disposition curieuse : ils ont tendance soit à se grouper à proximité et perpendiculairement à la membrane soit, moins souvent, à former des amas au centre des cellules. Nous n'en avons jamais rencontrés dans le liège. Il n'est pas possible non plus de trouver des « foyers » internes ou périphériques à partir desquels on pourrait considérer que l'infection ait progressé.

Dans le matériel ainsi traité, le chondriome se présente sous forme de mitochondries généralement groupées le long de la paroi. Les grains d'amidon n'ont plus l'aspect habituel : les stries concentriques disparaissent ; les contours des grains deviennent irréguliers et sont marqués d'une bordure sombre et sinueuse entourant une zone centrale plus claire. En lumière polarisée bien qu'ils soient morphologiquement tous identiques, certains grains ne présentent plus le phénomène de croix noire.

2° Tubercules en période de repos végétatif :

Nous avons pu retrouver dans du matériel n'ayant subi aucun traitement, les petits amas bleus de cocco-bacilles que nous avons précédemment décrits : ils sont toujours de petite taille et ne comptent qu'un nombre restreint de micro-organismes (10 à 20). Quels en sont les caractères distinctifs ?

— Ce sont les seules inclusions bleu-foncé de la cellule : coloration caractéristique des bactéries dans la méthode que nous utilisons. Les grains d'amidon et la membrane prennent également la couleur bleue. Les plastes, les mitochondries sont rouges ou orangés.

— Ces micro-organismes baignent toujours dans une substance qui se colore en bleu plus clair, vraisemblablement du mucilage, ceci rend d'ailleurs l'observation assez difficile. Il est néanmoins toujours possible de faire une mise au point précise sur l'un ou l'autre des micro-organismes.

— Nous n'avons jamais tenu compte des granulations bleues isolées ou même groupées par deux.

— Nous vérifions évidemment si la colonie observée se trouve bien dans le plan de la coupe et si elle appartient au territoire cellulaire.

— Lorsque la colonie est importante nous la recherchons sur la lame dans la cellule correspondante des coupes précédente et suivante.

Les bacilles proprement dits tels que nous les avons vus apparaître après paraffinage n'ont pas été mis en évidence dans les tubercules normaux.

Dans les tissus périphériques des tubercules âgés, les micro-organismes sont rares mais ils ont tendance à être un peu plus fréquents dans les parties profondes de l'organe. Souvent les cellules qui en contiennent sont dépourvues ou presque de grains d'amidon ; lorsqu'ils existent les bactéries sont à proximité ou quelquefois même à leur contact (*pl.* III, 10). Dans ce cas les grains d'amidon paraissent altérés : ils présentent nettement deux zones : l'une, colorée normalement par le bleu de Unna ; l'autre, beaucoup plus pâle où la substance du grain est plus diffuse et où se trouvent les bactéries.

Dans les cellules du parenchyme médullaire les colonies sont fréquemment très proches des parois et parfois même nous avons trouvé de part et d'autre d'une même membrane cellulaire deux amas qui se correspondaient.

De l'ensemble de ces examens on peut conclure que les cellules des tubercules de pomme de terre sains hébergent des bactéries ; elles sont groupées en colonies, prennent la coloration bleue par la méthode de MILOVIDOV. Les cellules atteintes sont relativement rares surtout dans les tubercules âgés au repos. Il n'existe pas de zones périphérique ou interne où la densité des micro-organismes soit plus importante et à partir desquelles on pourrait considérer que l'infection ait progressé. La répartition des bactéries est toujours très diffuse.

Le nombre important d'examens réalisés à partir de très nombreux fragments provenant de tubercules différents ne permet pas de considérer ces résultats comme accidentels, il s'agit au contraire d'un phénomène régulièrement observé.

3° Structure histologique d'un tubercule de pomme de terre :

La structure histologique d'un tubercule de pomme de terre présente nettement deux zones : l'une, externe ou corticale ; l'autre, interne ou médullaire ; elles sont séparées par les vaisseaux libéro-ligneux formant l'anneau vasculaire (*fig.* 1, *p.* 61).

La zone corticale ou cortex est limitée par plusieurs couches de cellules subérifiées (*pl.* IV, 1) qui protègent le parenchyme cortical. Ce dernier comprend deux types de cellules.

Dans les plus externes, plus petites où l'amidon est très rare, on peut observer :

- des cristalloïdes cubiques très colorés en rouge qui seraient selon ARTSHWAGER (1918), de nature protéique (*pl.* IV, 2) ;
- des petits plastes, colorés en rouge (*pl.* IV, 3) ;
- des cellules complètement occupées par des cristaux d'oxalate de calcium (*pl.* IV, 4) ;
- des grandes cellules à parois épaisses et ligneuses (*pl.* IV, 5).

En se rapprochant de l'anneau vasculaire les cellules du parenchyme cortical s'agrandissent et, au voisinage des vaisseaux elles présentent des grains d'amidon (*pl.* IV, 6).

L'anneau vasculaire : dans le tubercule jeune les faisceaux libéro-ligneux sont noyés dans un parenchyme amylofère. A mesure que l'organe

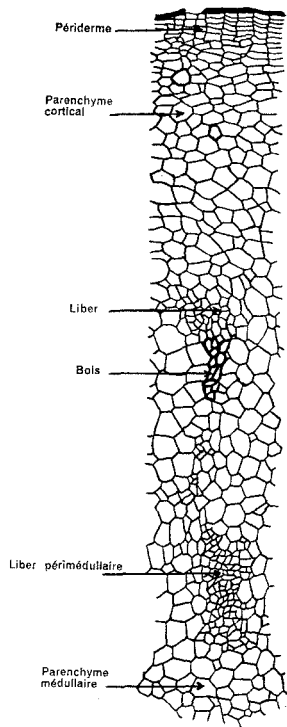


FIG. 1. — Structure histologique du tubercule de pomme de terre.

vieillit, les îlots se rejoignent et l'assise génératrice devient continue mais ne produit cependant que peu d'éléments secondaires. Des massifs de liber interne ou périmédullaire sont disposés suivant un ou plusieurs cercles, mais ils demeurent indépendants les uns des autres.

La moelle : c'est le tissu qui, en volume, occupe la plus grande partie du tubercule. C'est un parenchyme de réserve bourré de grains d'amidon ; leur nombre, cependant, diminue à mesure que l'on se rapproche du centre. Dans ce tissu les cellules se divisent activement et c'est essentiellement en raison de leur prolifération que les tubercules croissent.

4° La période de germination :

Lorsque après la période hivernale le développement des bourgeons commence, la localisation et le nombre de bactéries semble subir d'importantes modifications (MONTUELLE, 1962 a). En effet, alors qu'au repos, nous l'avons vu, des micro-organismes assez rares sont remarqués surtout dans les parties profondes, si l'on examine des coupes réalisées dans le tubercule à proximité des bourgeons naissants ou faiblement développés, on constate que les bactéries, assez nombreuses, sont localisées essentiellement de part et d'autre des éléments conducteurs et

particulièrement au niveau de la courbure qu'ils subissent pour pénétrer dans les tissus néoformés. Les cellules hôtes sont allongées et pauvres en amidon.

Cette localisation est tout à fait caractéristique : nous l'avons retrouvée dans 10 tubercules différents. Les colonies, par rapport à celles que nous avons décrites dans les organes mûrs, ont changé d'aspect : leur importance est trois ou quatre fois plus grande, elles sont moins condensées, sont situées surtout au voisinage des membranes dans des cellules très pauvres en inclusions ; certaines renferment plusieurs colonies (*pl. III*, 5 à 9). Corrélativement peut-être, les micro-organismes sont, à ce stade de reprise d'activité des tubercules, beaucoup moins fréquents dans le parenchyme médullaire.

Dans les jeunes bourgeons (environ 1 cm de longueur) c'est encore à proximité des éléments conducteurs que sont principalement localisées les bactéries (*fig. 2*). Les cellules qui en hébergent (*pl. V*, 1) sont situées de part et d'autre du cordon libéro-ligneux et dans le parenchyme médullaire. Nous n'avons que très rarement noté la présence de colonies dans les vaisseaux. En coupe transversale nous avons pu préciser l'existence de bactéries dans les cellules de l'endoderme (*pl. V*, 2).

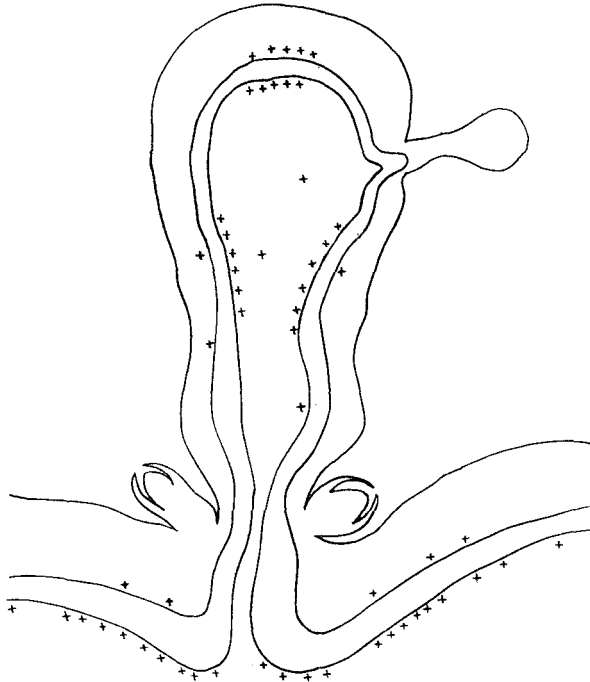


FIG. 2. — Schéma de l'insertion d'un bourgeon et localisation des colonies bactériennes (+).

Les zones méristématiques situées à l'extrémité des « germes » principaux et secondaires sont dépourvues de colonies bactériennes.

On sait que, dans la région de formation des bourgeons, se produit à la fois la dégradation de l'amidon et son élaboration dans les jeunes plastes des tissus en formation. Nous avons remarqué régulièrement que les bactéries sont en plein développement là où l'hydrolyse de l'amidon est importante (grains d'amidon en masses jaune-verdâtre). Par contre dans les cellules où s'opère surtout la synthèse (amyloplastés coiffés de la calotte plastidale on ne trouve jamais de micro-organismes autrement qu'en colonies de très faible taille.

5^o Période de végétation :

Nous avons poursuivi l'examen des micro-organismes et leur évolution au sein des tissus pendant la période de végétation (1).

Nous avons fixé et préparé pour la cytologie des stolons et des jeunes tubercules récoltés après 38, 45 et 52 jours de végétation en pleine terre.

Dans les coupes longitudinales de stolons proches du tubercule nourricier les bactéries sont presque exclusivement situées dans les vaisseaux et plus particulièrement ceux du bois. Les colonies ont des dimensions comparables à celles qu'elles avaient dans le tubercule d'origine. On en rencontre sur toute la longueur du stolon mais l'importance des colonies augmente nettement au fur et à mesure qu'est plus proche le lieu de formation des jeunes tubercules. Près d'eux, en effet, les amas bactériens sont assez nombreux et importants dans les vaisseaux du bois ; ceci permet de penser qu'à ce niveau du stolon elles trouvent des conditions favorables à leur développement.

Dans les jeunes tubercules les bactéries, situées surtout dans le parenchyme médullaire, sont relativement fréquentes (surtout chez les plus jeunes ayant approximativement 5 à 7 mm de diamètre), mais leur nombre diminue quand le tubercule croît.

Toutes ces observations montrent donc (*fig. 3, p. 64*), que le nombre et la localisation des bactéries hébergées par les cellules des organes souterrains de la pomme de terre varient avec la situation et l'âge du tissu considéré. Elles posent aussi la question des fluctuations du nombre de ces micro-organismes en fonction des conditions physiologiques régnant dans les cellules.

Les examens cytologiques, particulièrement intéressants dans la région des germes, puisqu'on y observe à la fois la synthèse et la dégradation de l'amidon, permettent de préciser que les bactéries se développent beaucoup mieux dans les cellules où se produit l'hydrolyse des glucides.

La teneur en sucres réducteurs, d'après les dosages biochimiques effectués par différents auteurs (ARTSCHWAGER, 1924 ; COLIN et FRANQUET,

(1) Nous tenons à ce sujet à remercier vivement la Fédération Française des Producteurs de Plants de pomme de terre Région Nord qui a aimablement mis à notre disposition son champ expérimental de Carvin.

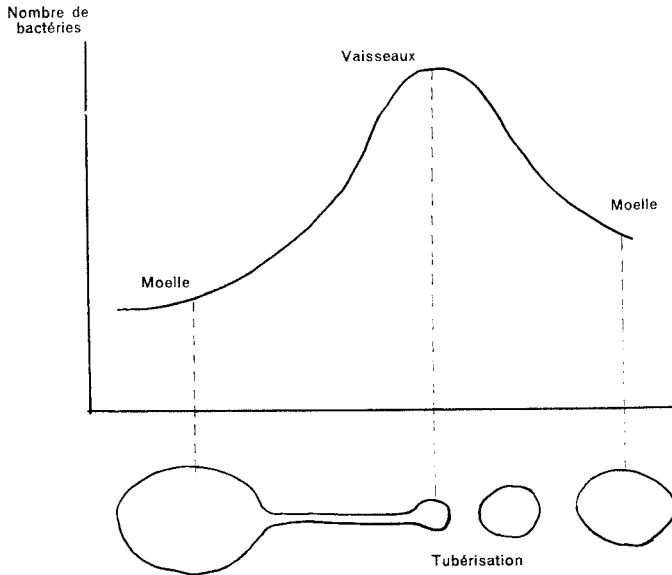


FIG. 3. — Schéma indiquant les variations de la population bactérienne au cours de la végétation.

1927) est fort élevée dans les tubercules très jeunes et dans les parties et stolons qui s'y rattachent, importante dans les tubercules en germination, faible dans les régions distales des stolons et presque nulle dans les tubercules mûrs au repos.

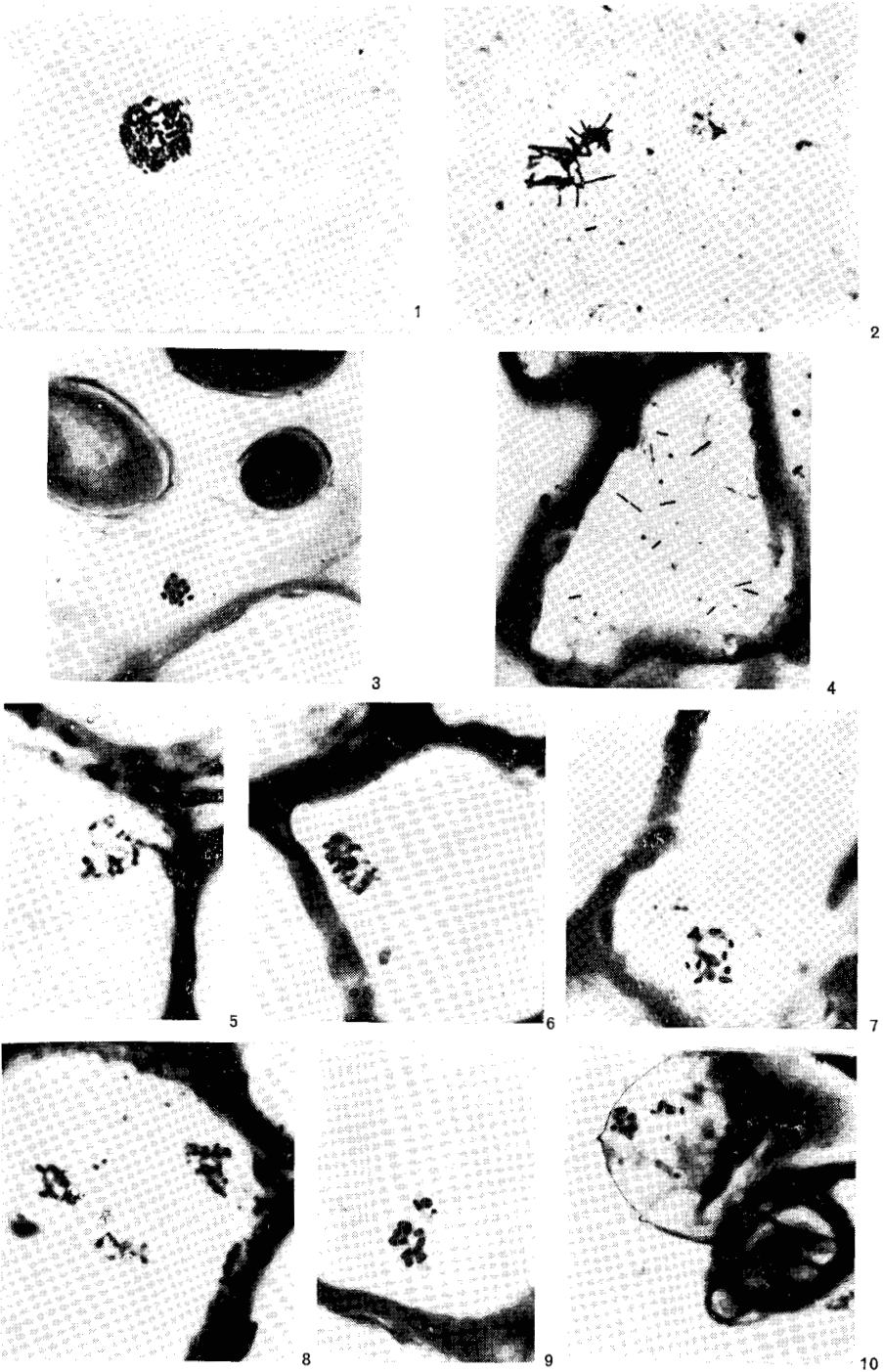
Il pourrait donc exister une relation entre la richesse d'un tissu en sucres réducteurs et le nombre de bactéries susceptibles de s'y développer.

6° Étude de tubercules atteints de la maladie des taches rouilles :

Certains tubercules présentent parfois à la coupure des taches sans relation avec les tissus superficiels et de couleurs diverses sur lesquelles les spécialistes ont établi une classification en distinguant les taches cendrées, plombées et rouilles. Les causes de ces maladies sont très imprécises. Les auteurs y voient le résultat de troubles du métabolisme dus aux conditions climatiques, culturales ou de conservation.

La maladie des taches rouilles a été surtout étudiée en Allemagne sous le nom d' « Eisenfleckigkeit ». Les tubercules apparemment sains montrent au sectionnement une chair parsemée de taches de différentes dimensions, de couleur rouge brique, isolées ou en grand nombre. Ces taches formées de matière inerte sont de forme irrégulière et peuvent être réparties régulièrement et concentrées dans la partie médiane ou bien ordonnées en forme d'arc. Elles ne doivent pas être confondues avec celles que provoque le mildiou : elles sont, dans ce cas, bien plus grandes et compactes et sont toujours en relation avec des taches de l'épiderme.

Planche III



Observations cytologiques de tissus de tubercules de pomme de terre

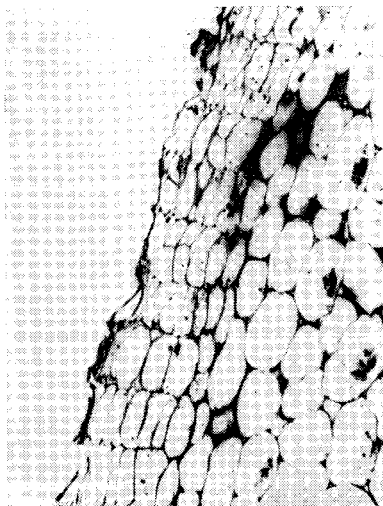
1 et 2 : Colonies bactériennes dans la pulpe écrasée.

3 et 4 : Bactéries *in situ*, dans des tubercules paraffinés.

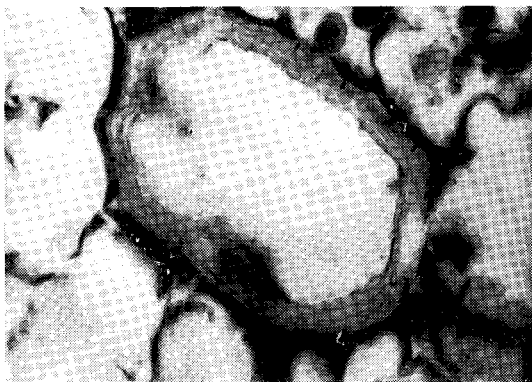
5 à 9 : Micro-organismes dans des cellules d'organes sains et normaux.

10 : Bactéries sur un grain d'amidon.

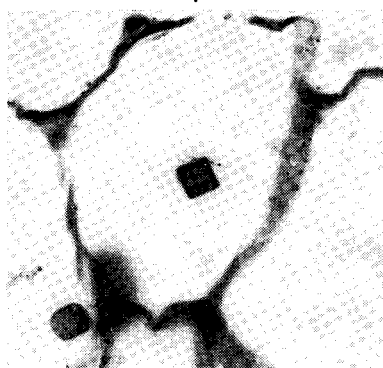
Planche IV



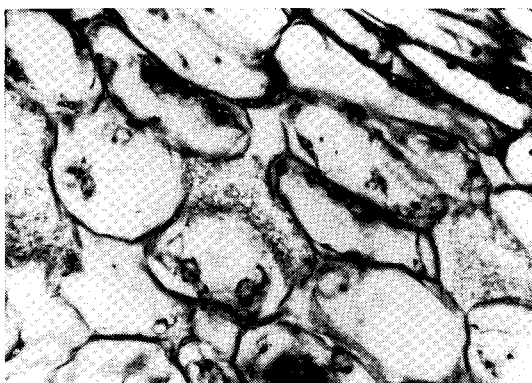
1



2



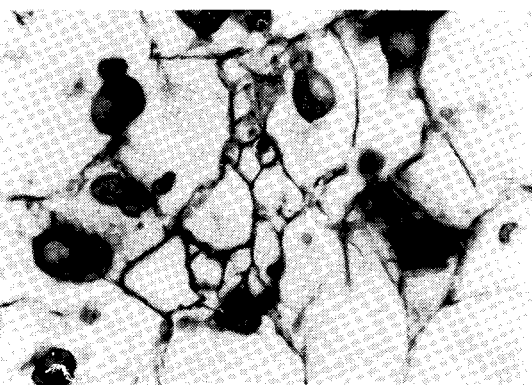
3



4



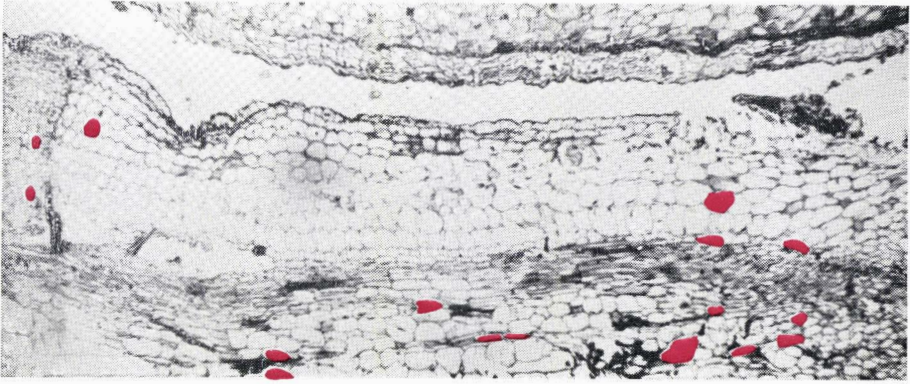
5



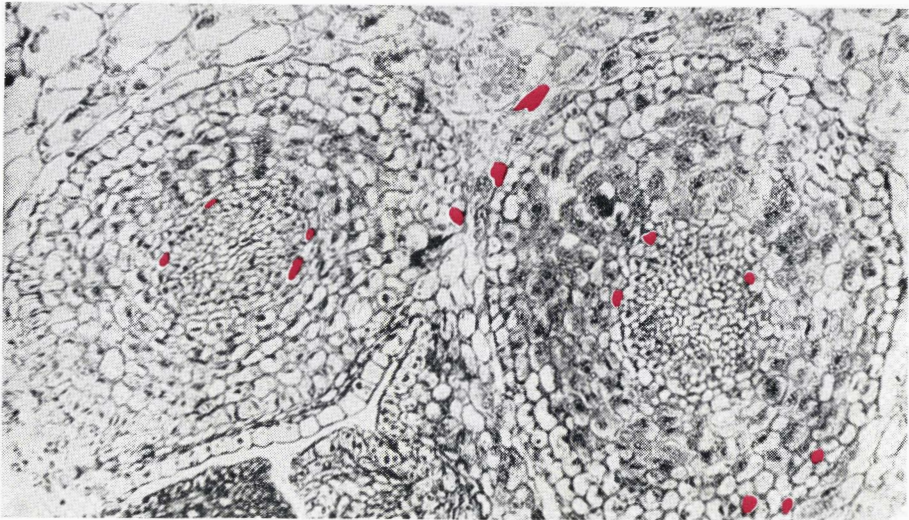
6

Coupes transversales dans les tissus périphériques d'un tubercule de pomme de terre.
1 : Le périderme. — 2 : Grande cellule fibreuse. — 3 : Un cristalloïde. — 4 : Cellules à oxalate. — 5 : Jeunes plastes. — 6 : Cellules amylières et liber périmedullaire.

Planche V



Coupe longitudinale. Répartition des cellules hôtes le long du cordon vasculaire



Coupe transversale

Noter la répartition des cellules hôtes : endoderme et parenchyme cortical

Tubercule de pomme de terre : coupes effectuées dans la zone d'insertion des bourgeons. Situation des cellules hôtes (●).

En passant en revue les travaux des auteurs qui ont étudié cette maladie, on constate que les causes en sont mal connues. On admet généralement qu'il s'agit d'un déséquilibre entre l'absorption de l'eau et la transpiration. Les taches rouilles se formeraient pendant la période de végétation, elles ne pourraient apparaître et se développer après la récolte et ne se transmettraient pas aux tubercules fils après la plantation. Un travail récent de EIBNER (1959), établit certaines relations entre la présence du virus de la mosaïque du tabac (Ratelvirus) et l'apparition des taches. Signalons enfin, qu'ATANASOFF (1926) a essayé d'expliquer la maladie par une bactériose mais n'a pu obtenir de résultats positifs.

Quand il nous est arrivé, à la faveur des très nombreux explantats que nous avons effectués dans les pommes de terre, de rencontrer des tubercules atteints de taches rouilles nous nous sommes demandé s'il n'était pas possible de les considérer comme une manifestation pathologique de la présence normale de bactéries dans les tissus sains. Aussi avons-nous procédé sur ce matériel et suivant les techniques exposées à des observations cytologiques (MONTUELLE, 1962 b).

A faible grossissement, le parenchyme présente des espaces vides alvéolaires, circulaires ou ovales et de taille très variable (*pl. VI, 1*), les uns correspondant à la surface occupée par quatre ou cinq cellules, les autres beaucoup plus grands. Les cellules qui occupaient ces espaces sont complètement détruites et il ne subsiste, à la périphérie de ces enclaves que quelques débris; celles qui bordent les alvéoles sont fréquemment ouvertes et présentent une coloration rouille qui rappelle la couleur des taches. Les membranes des cellules péri-alvéolaires semblent très fragiles : elles montrent des plis ou des ruptures.

A plus fort grossissement on constate que presque toutes les cellules de la coupe renferment des bactéries : elles sont situées surtout le long des membranes (*pl. VI, 2*) mais de plus en plus nombreuses à mesure que l'on se rapproche des alvéoles, elles occupent par centaines tout l'intérieur des cellules (*pl. VI, 3*). Nous avons souvent observé des amas considérables de cocci ou de cocco-bacilles; cependant les enclaves sont vides.

Nous avons procédé, suivant les techniques déjà décrites à l'isolement de souches bactériennes à partir d'explantats réalisés dans la région des taches. En plus des espèces hébergées par les tubercules sains (*Bacillus megaterium*, *B. subtilis*, *B. polymyxa*, *B. cereus*, *B. licheniformis*) nous avons pu isoler une souche particulière. Sur gélose nutritive, en effet, elle se développe lentement, formant un cal cartilagineux qui s'entoure d'une auréole provoquée par la diffusion dans le milieu d'un colorant rouille rappelant la couleur des taches. Sur tranche de pomme de terre, cette souche croît également lentement en prenant l'aspect d'un bourrelet rouille. Il nous a paru intéressant d'essayer d'inoculer cette souche à des tubercules vivants, mais, jusqu'ici nous n'avons pas réussi à provoquer la formation de taches. La détermination de l'espèce est en cours.

La présence de bactéries en si grand nombre dans les cellules provoque évidemment un certain nombre de modifications importantes, surtout pour les grains d'amidon et les noyaux.

Par rapport aux coupes d'organes sains, les grains d'amidon sont moins nombreux les plus gros présentent des figures de corrosion

évidentes : fentes radiaires atteignant le centre du grain ou érosion de surface caractéristique ; un grand nombre sont très petits, aplatis, leur centre est incolore et il ne subsiste plus qu'un cerne légèrement coloré. Parfois même, c'est uniquement la présence de bactéries disposées sur le pourtour des grains qui permet de les distinguer encore (*pl.* VI, 5). Notons aussi le nombre très important de plastes (*pl.* VI, 4).

La dégénérescence cellulaire atteint bien entendu elle aussi la structure nucléaire (*pl.* VII, *a* à *n*) : au cours de la première phase de l'infection parasitaire, c'est-à-dire dans les parties les plus périphériques des alvéoles, les noyaux gardent leur structure et leurs contours arrondis normaux ; certains parfois sont de grande taille (*g*). Les nucléoles fortement colorés par la fuchsine, émettent de petits bourgeons (*d* et *g*) parfois très nombreux.

Dans les zones plus dégradées, les noyaux prennent un aspect spongieux dû à la formation de petites logettes sphériques achromophiles ; ce type de dégénérescence, différent de la pycnose, a été décrit sous le nom d'alvéolisation. En même temps les contours nucléaires deviennent assez diffus, irréguliers (*j*) et souvent festonnés (*a*, *c*, *k*) par suite de l'ouverture des bords de certaines alvéoles. Dans de tels noyaux, les nucléoles sont souvent très intensément colorés ; les bourgeons que nous avons vu se former au cours de la première phase se sont détachés et ont considérablement grossi (*e*) ; certains, à la faveur de la dégradation du suc nucléaire passent dans le cytoplasme (*i*), d'autres semblent perdre leur chromatinité (*c*), mais ils sont toujours nombreux et parfois même très nombreux (12 en *m* et 25 en *n*). La photo *n* (*pl.* VII) nous semble d'ailleurs particulièrement intéressante : on y voit, en effet, à gauche une partie qui est presque complètement nécrosée par alvéolisation et dans laquelle il ne subsiste aucun nucléole ; au contraire, dans la moitié droite qui représente certainement un stade de résistance précédant la dégénérescence, les nucléoles sont très nombreux.

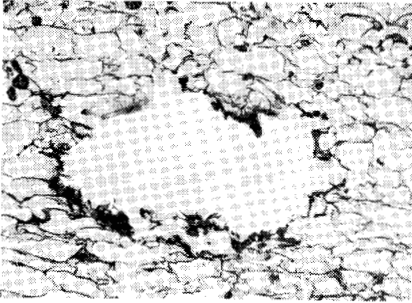
Les images que nous venons de décrire sont donc essentiellement caractérisées par un bourgeonnement nucléolaire intense qui aboutit à la formation d'un nombre souvent important de nucléoles fils.

Ces structures sont voisines de celles qui ont été observées d'une part, dans le cas de maladies parasitaires provoquées par les champignons, les bactéries (nodosités des Légumineuses), des virus (crown-gall), des insectes et, d'autre part, lors des troubles de métabolisme provoqués artificiellement par des poisons physiques ou chimiques.

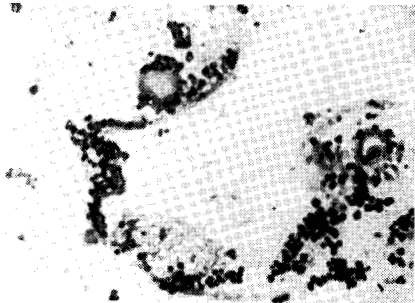
Signalons en particulier que MALVESIN-FABRE et EYME (1950), ont noté dans les cellules à mycorhizes chez *Limodorum abortivum*, une augmentation importante du nombre des nucléoles dans les cellules en cours d'infestation progressive. HOCQUETTE (1929), étudiant les réactions parasitaires de cellules d'*Alnus glutinosa* infectées par des bactéroïdes, a observé une hypertrophie cellulaire, nucléaire et nucléolaire. Les travaux de MEYER (1950), sur la formation des zoocécidies rapportent de nombreux cas de gigantisme nucléolaire.

L'infection parasitaire provoquerait une diminution importante du taux d'acides nucléiques cytoplasmiques, celle-ci déterminerait à son tour une multiplication considérable des surfaces nucléolaires qui

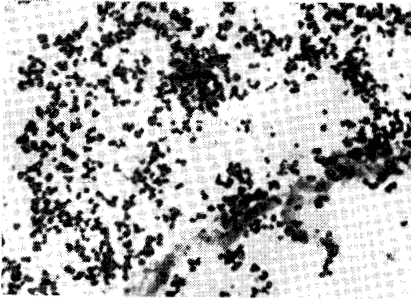
Planche VI



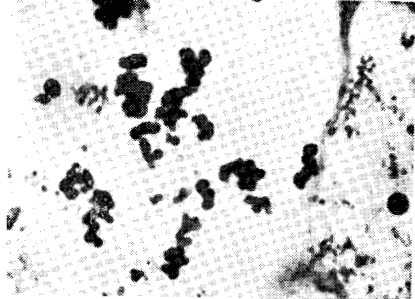
1



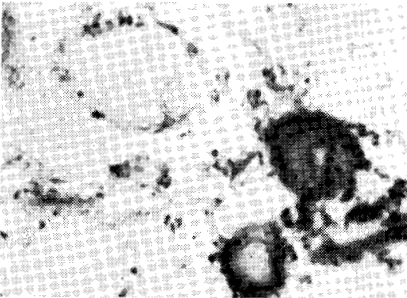
2



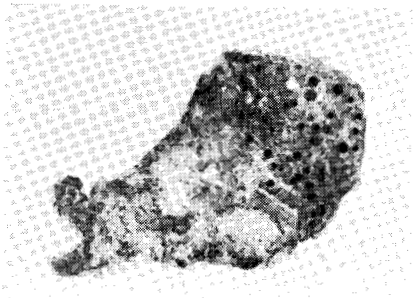
3



4



5

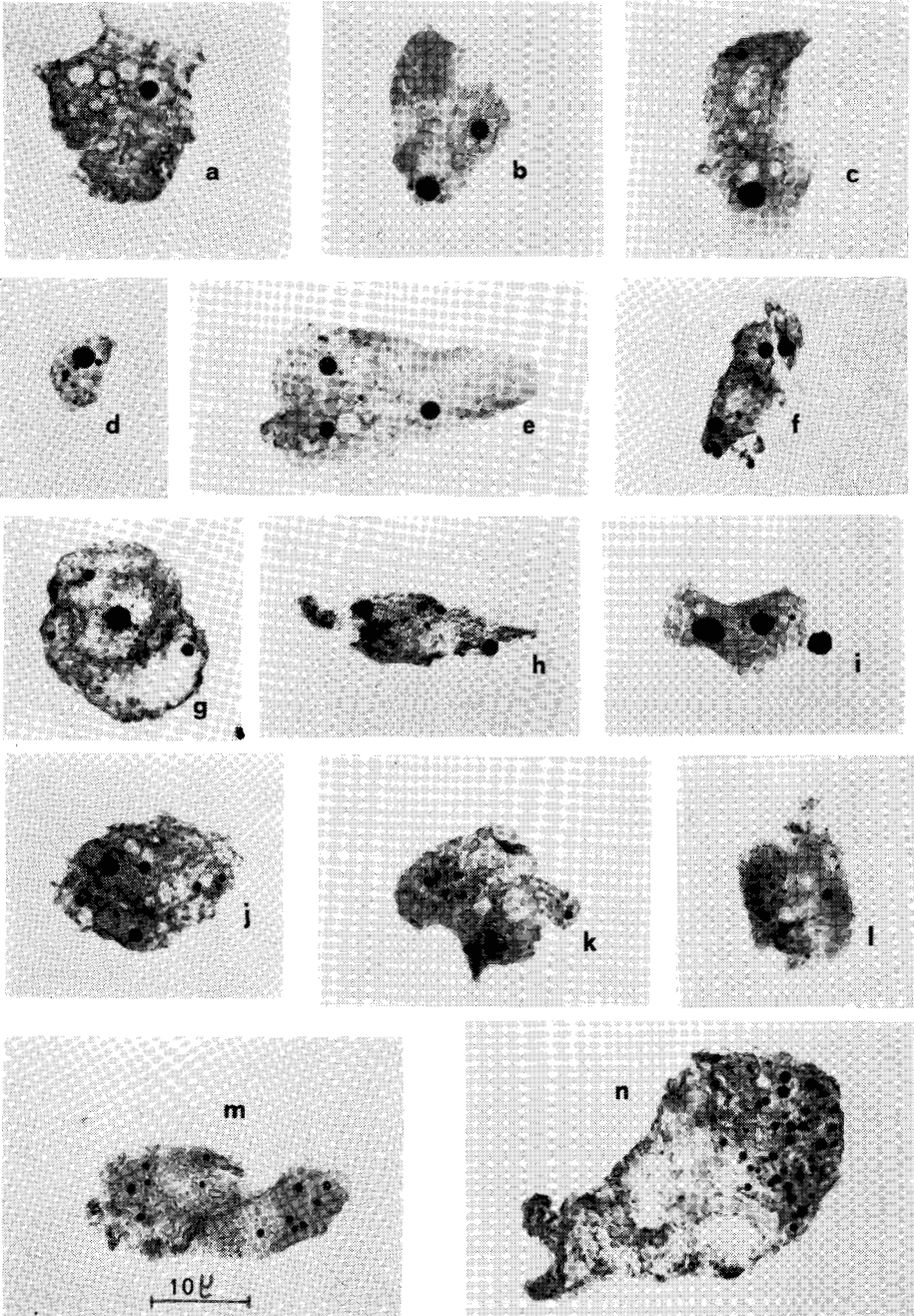


6

Coupes effectuées dans des tubercules atteints de la maladie des laches rouilles

1 : Alvéole. — 2 et 3 : Amas bactériens et débris cellulaires. — 4 : Plastes. — 5 : Grains d'amidon dégradés. — 6 : Dégénérescence nucléaire.

Planche VII



Modifications caryologiques dans les tissus de pomme de terre atteints de la maladie des taches rouilles.

traduit une augmentation notable de la protéogénèse. Les glucides solubles dont la teneur s'accroît également pourrait servir de source d'énergie à ces synthèses. Quoi qu'il en soit dans la maladie étudiée ici, le parasite, après cette période d'active résistance des cellules prend rapidement le dessus et la dégénérescence nucléaire complète suit de peu celle du cytoplasme.

L'ensemble de ces observations et isollements, sans écarter complètement les hypothèses actuelles sur l'étiologie de la maladie, amène à penser que des bactéries interviennent dans l'apparition des taches rouilles. Les modifications locales du métabolisme, ou l'affaiblissement de certaines cellules par les virus, permettraient aux bactéries (ou plus particulièrement peut-être à une espèce) normalement présentes dans les tissus de se développer sporadiquement. Étant donné : d'une part, la présence normale des micro-organismes dans les cellules apparemment saines et, d'autre part, l'absence de relation entre les taches et la périphérie des organes, la maladie pourrait s'expliquer sans pénétration directe de bactéries à partir d'un foyer extérieur d'infection.

III. — ÉTUDE DES RACINES TUBERISÉES DE BETTERAVE

Les fragments étudiés ont toujours été prélevés à 3 cm du collet dans de jeunes racines ou « *planchons* » provenant de semis estivaux récoltés à la fin de l'automne et se trouvant au moment de la fixation en période de repos végétatif.

Le fixateur est identique à celui que nous avons utilisé pour étudier les pommes de terre. La méthode de coloration de Milovidov, précédemment exposée a nécessité quelques adaptations à ce nouveau matériel. Nous avons en particulier accentué la coloration bleue de deux façons différentes :

- augmentation de la concentration du colorant bleu ;
- diminution du temps de différenciation au tanin orange.

1° Étude des racines normales ou soumises à différents traitements :

Chez la betterave, comme chez de nombreuses plantes de la famille des Chénopodiacées la tubérisation des racines résulte de la formation d'assises génératrices libéro-ligneuses surnuméraires.

La disposition de tissus (*fig. 4, p. 68*) est la suivante :

— Le *centre* des coupes est occupé par les faisceaux ligneux primaires entourés d'un anneau continu de bois secondaire normal. Le cambium qui donne naissance à ce dernier cesse assez rapidement de fonctionner et, dans la région péricyclique, une nouvelle assise dite surnuméraire prend naissance. Elle engendre un nouveau cercle de liber et de bois concentrique et extérieur aux tissus secondaires normaux. Les formations ligneuses surnuméraires sont pauvres en vaisseaux et sont surtout constituées de cellules parenchymateuses. Le liber est peu important. Après un certain temps d'activité ce cambium supplémentaire s'arrête et un

nouveau se différencie à l'extérieur du précédent. La répétition de ce processus aboutit à la formation, autour des tissus secondaires normaux, de plusieurs cercles libéro-ligneux surnuméraires entrecoupés par des rayons médullaires.

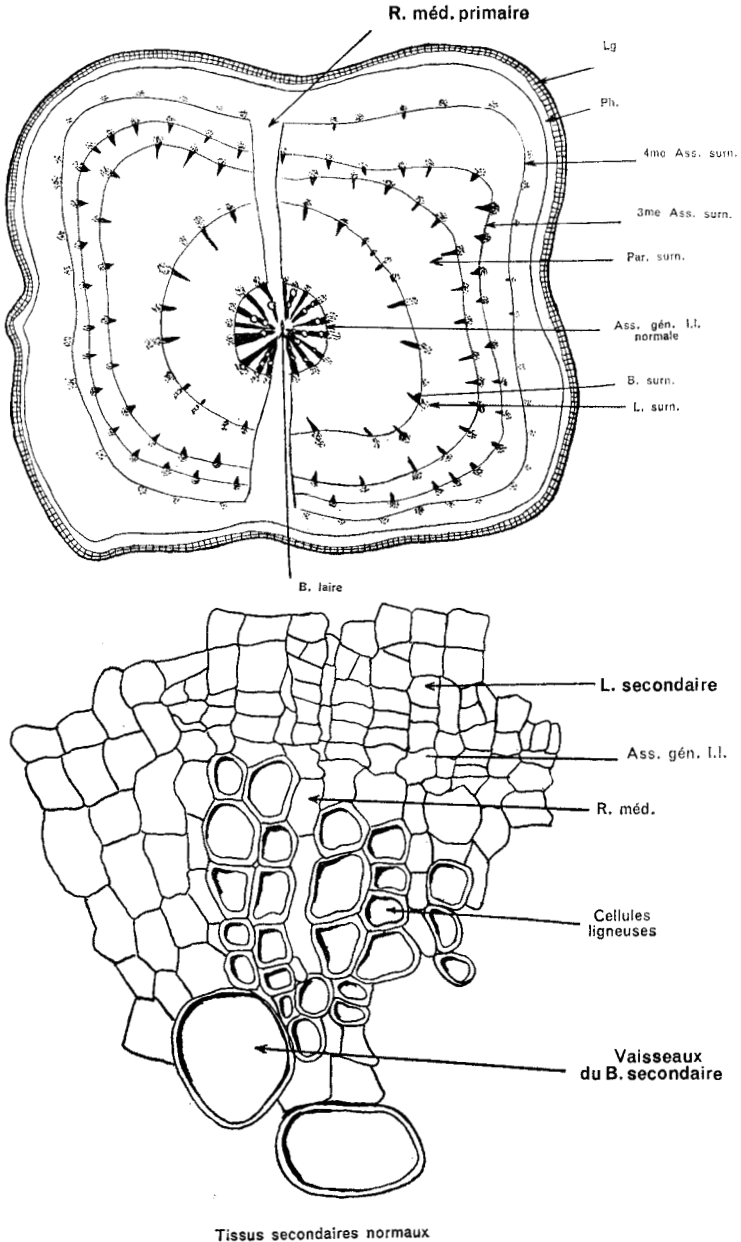
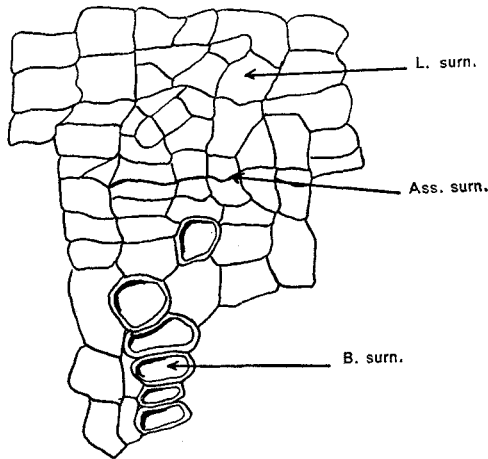


FIG. 4 a — Structure histologique de la racine de betterave.



Tissus surnuméraires

FIG. 4 b. — Structure histologique de la racine de betterave.

R. méd. laire = Rayon médullaire primaire.

Lg = Liège ; P = Phelloderme ; Ass. surn. = Assise surnuméraire.

Ass. gén. l. l. = Assise génératrice libéro-ligieuse ; B = Bois ; L = Liber.

A la *périphérie* quelques couches de liège, le phelloderme et le parenchyme cortical protègent l'ensemble des tissus tubérisés.

L'observation des coupes à l'immersion nous a permis de mettre en évidence (*pl. VIII, 1*), un très faible nombre de colonies bactériennes formées par le groupement de quelques cocci ou cocco-bacilles. Nous ne leur avons pas remarqué de localisation particulière : elles existent aussi bien à la *périphérie* qu'au centre de l'organe. On rencontre approximativement une cellule hôte pour 1.000 cellules observées.

Par contre, si l'on soumet les planchons à certains traitements identiques à ceux que nous avons décrits pour la pomme de terre, on parvient à augmenter notablement le nombre de micro-organismes au sein des tissus (*pl. VIII, 2 et 3*).

Dans les racines paraffinées huit jours, le nombre de bactéries par colonie atteint parfois une centaine. Les difficultés de mise au point lors de l'examen microscopique et la légère coloration bleu-pâle entourant les bactéries semblent ici aussi révéler l'existence d'un « ciment » mucilagineux. Nous avons noté qu'il existait des cocci de deux dimensions différentes.

Pour essayer de comparer entre eux les différents traitements nous avons, en retenant les coupes les plus riches en bactéries, calculé les pourcentages de cellules renfermant des microorganismes. 18,5%

des cellules de la *zone périphérique* des racines paraffinées hébergent des bactéries : elles se trouvent surtout dans le phelloderme et les cellules voisines de l'écorce. Nous avons exceptionnellement pu remarquer la présence de bâtonnets dont certains semblaient sporulés. Dans la *zone centrale* nous avons relevé 20 % de cellules hôtes dont 18 % dans les tissus conducteurs et principalement dans le bois (parenchyme ligneux et vaisseaux).

Lorsque les racines ont séjourné, après stérilisation de surface pendant une semaine sous vide, on note, en périphérie par rapport au cas précédent une très nette diminution du nombre des micro-organismes. Les colonies ne comptent plus qu'une dizaine de bactéries et la substance mucilagineuse semble avoir disparu. Les tissus hôtes sont le phelloderme (1 % de cellules hôtes), l'écorce (1 %), le parenchyme secondaire surnuméraire (2 %).

Dans la partie centrale de l'organe les colonies sont beaucoup plus importantes que sur le pourtour. Le pourcentage de cellules envahies s'élève à 11 % dont 7,4 % appartiennent au parenchyme des rayons médullaires et 3,6 % aux cellules ligneuses et au parenchyme secondaire situé au voisinage du bois.

L'action de l'oxygène, pendant une durée de huit jours, se traduit dans la zone périphérique, par la présence à côté de colonies de cocco-bacilles, de bâtonnets dans les cellules du bois secondaire surnuméraire où ils sont parfois très abondants.

Il est tout à fait exceptionnel de rencontrer des bactéries dans les vaisseaux du bois. Dans les tissus plus internes, notamment le bois secondaire normal on n'observe plus que les colonies habituelles cocco-bacillaires. Les numérations donnent 10,8 % de cellules hôtes pour l'ensemble de l'organe.

Le séjour dans une atmosphère d'azote permet d'atteindre des pourcentages de cellules hôtes encore plus élevés, notamment dans la région centrale (26 %). Dans les cellules périphériques (11,8 %) les colonies sont parfois très volumineuses.

De l'ensemble de ces résultats nous pouvons conclure à l'existence normale, de micro-organismes, au sein de certaines cellules ; ils sont très peu nombreux dans le matériel en repos végétatif que nous avons examiné. Cependant certains traitements et en particulier le séjour des plançons sous azote sont capables de provoquer la multiplication importante des bactéries au sein des cellules. Il n'existe sur le pourtour comme au centre de l'organe aucune zone où les cellules seraient toutes atteintes : ceci permet d'écarter, d'une part, l'hypothèse d'une pénétration de bactéries à partir de la surface et, d'autre part, la possible existence de « *foyers d'infection* » à partir desquels il y aurait eu progression des microbes. Il nous semble qu'il faille plutôt considérer que les colonies, rendues visibles par leur accroissement artificiel, résulteraient de la multiplication de bactéries initialement présentes dans les cellules.

Pour la betterave nous ne disposons pas d'observations cytologiques correspondant à des états physiologiques différents mais il est possible que dans ce cas comme dans celui de la pomme de terre, la population bactérienne varie au cours de la végétation.

La multiplication des bactéries qui se produit au cours des différents traitements peut s'expliquer de diverses façons :

- action directe de l'atmosphère gazeuse sur la vitalité des bactéries ;
- apparition, à la faveur des déviations du métabolisme imposées par les conditions extérieures, de substances trophiques ou oligodynamiques favorables aux micro-organismes ;
- levée d'une inhibition de type antibiose qui s'opposait jusque là à la prolifération des bactéries.

2° Modifications nucléaires sous l'influence de l'azote gazeux

En même temps que nous recherchions les bactéries dans les cellules nous nous sommes attaché à observer les modifications cytologiques attribuables aux divers traitements subis par le matériel. Nous avons pu ainsi faire un certain nombre de remarques dont l'exposé nous entraînerait en dehors des limites de ce mémoire.

Pourtant nous nous intéresserons aux structures nucléaires présentées par les fragments soumis à l'atmosphère d'azote car nous pensons qu'elles peuvent être en rapport avec la présence des bactéries.

Des travaux antérieurs ont montré qu'il existait des relations si étroites entre la structure d'un noyau quiescent et le métabolisme cellulaire que la morphologie des premiers traduisait le second par des images cytologiques précises. L'aspect d'un noyau quiescent permet ainsi d'évaluer l'activité physiologique de la cellule.

MAIGE (1923), a établi que, lorsque les dimensions du noyau et du nucléole ne varient pas, l'état physiologique de la cellule reste constant. Si ce dernier change, les volumes nucléaires et nucléolaires sont modifiés : un nouvel équilibre s'établit. Lorsque le jeûne notamment a provoqué une diminution de ces territoires on peut obtenir une augmentation de leur volume en apportant des aliments glucidiques. Exemple : les noyaux et les nucléoles des embryons de haricots privés de leurs cotylédons mis à jeûner sur papier mouillé, retrouvent après quarante-huit heures en présence d'une solution de saccharose à 5 % un volume identique au primitif et voire même supérieur.

HOCQUETTE et PRUDHOMME ont montré (1952, *a* et *b*), qu'aux modifications de taille correspond une transformation structurale. La reprise de l'activité cellulaire est caractérisée par l'augmentation du nombre des amas chromatiques, l'accroissement de volume du nucléole, l'apparition à sa surface d'une couche plus ou moins riche en acide désoxyribonucléique, le bourgeonnement nucléolaire et même quelquefois la fragmentation nucléaire. Dans les expériences de ces auteurs, réalisées comme les précédentes sur des embryons de haricot en état de jeûne, l'apport d'aliments glucidiques réveille des synthèses protidiques et celles-ci sont révélées par les images cytologiques.

Par la méthode de Milovidov (très voisine de celle de Volkonsky) que nous avons utilisée, les nucléoles (acide ribonucléique) sont colorés en rouge (fuchsine) ; au contraire les zones riches en acides désoxyribonucléiques sont bleues (bleu de Unna).

Dans ces conditions l'examen des coupes de fragments de racines de betterave en repos hivernal, soumises pendant huit jours à une atmosphère d'azote, et leur comparaison avec des coupes témoins montre que les cellules sont en état d'hyperactivité. En effet, l'enchylème nucléaire est chargé de très nombreuses masses chromatiques ; les nucléoles volumineux, fushsinophiles, bourgeonnent activement ; leurs contours sont marqués d'un liseré bleu. Les néoformations nucléolaires offrent les mêmes caractères que les nucléoles eux-mêmes, une calotte seulement ou toute leur surface est colorée en bleu ; elles se détachent du nucléole principal et baignent dans la caryolymphe où elles sont parfois très nombreuses (6 ou 7). Dans les cas extrêmes nous avons vu certaines de ces formations sortir du noyau lui-même.

Nous avons prolongé au-delà de huit jours le séjour des plançons en atmosphère d'azote : l'activité nucléaire ne s'atténue pas, elle s'accroît au contraire. Les phénomènes de bourgeonnement nucléolaire se poursuivent ; mais on remarque surtout qu'à partir de quinze jours d'expérience des caryocinèses suivies de cloisonnement se produisent. La *planche VIII*, 4 à 8, montre les aspects de ces noyaux : on voit que la jeune et fragile membrane qui les sépare est de formation très récente. On note également que la situation et la taille des nucléoles sont fréquemment symétriques par rapport à la cloison néoformée.

Ces images n'ont pas été retrouvées, en dépit d'observations prolongées, dans des racines témoins non traitées. Il y a donc bien dans nos expériences, sous l'influence de l'azote, gazeux, une augmentation de l'activité du métabolisme qui peut aller jusqu'à provoquer la division nucléaire et cellulaire.

Les tissus dans lesquels nous avons pu faire ces observations sont assez variés. Dans la région périphérique, immédiatement en dessous du liège nous avons remarqué jusqu'à 5 cellules contiguës dont le noyau venait de se diviser, constituant ainsi une véritable ébauche d'assise génératrice.

Des divisions se produisent aussi dans les parenchymes des zones vasculaires et corticales au sein de cellules qui sont parfois de très grande taille.

Tout ceci indique que l'activité cellulaire est intense et qu'en particulier les synthèses protidiques sont notables. Ce réveil d'activité n'est attribuable qu'à l'azote puisque c'est la seule variable par rapport au témoin. On peut donc penser qu'il interviendrait dans le métabolisme. Y a-t-il réellement gain de substances azotées ou simplement, sous l'influence d'un apport énergétique dû aux transformations glucidiques consécutives à l'asphyxie des tissus, s'agit-il d'une pulvérisation des acides nucléiques, d'un passage des acides ribonucléiques du nucléole au sein du cytoplasme ? Nous ne pouvons, par la cytologie, apporter de réponse à cette question, aussi avons-nous entrepris des dosages chimiques dont nous parlerons dans ce chapitre pour ne pas morceler cet exposé à l'excès.

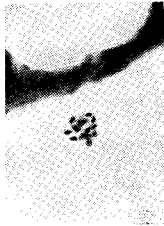
3^o Analyses chimiques après séjour en atmosphère d'azote. Expériences avec l'azote 15.

Par la méthode classique de Kjeldahl on évalue, dans une substance organique, la quantité d'azote présent sous les formes protidique, amidée,

Planche VIII



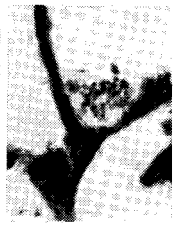
4



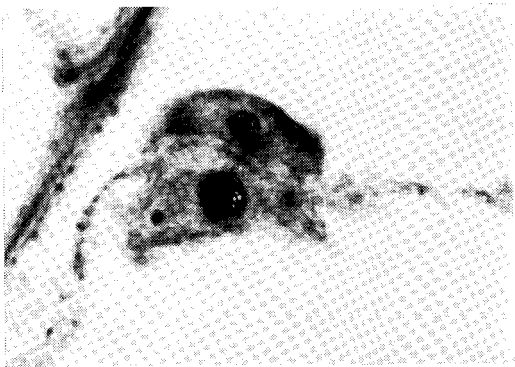
1



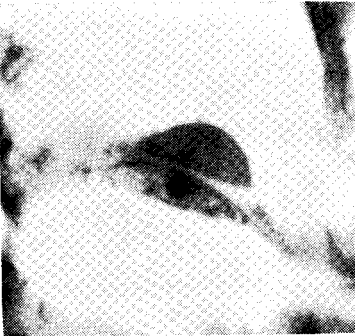
2



3



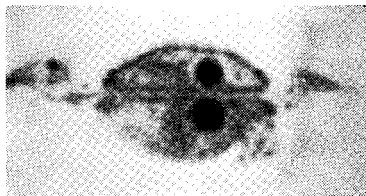
5



6



8



7

Observations cytologiques dans des racines tubérisées de betterave

1, 2 et 3 : Colonies bactériennes intracellulaires.

4 à 8 : Images nucléaires dans des tissus ayant séjourné sous azote.

aminée et ammoniacale. Les nitrites et nitrates, s'ils existent ne sont pas dosés. C'est pourquoi, dans la méthode de Joldbauer on transforme par l'acide phényl-sulfurique l'azote nitreux et nitrique en nitrophénol qui est ensuite réduit par le zinc en amidophénol. Ce dernier composé entre alors dans le groupe des produits dosés par la méthode de Kjeldahl que l'on applique ensuite. On peut donc de cette façon connaître la quantité d'azote total contenue dans un échantillon.

Les plançons sont coupés longitudinalement en deux : une moitié est soumise immédiatement au dosage, l'autre est placée dans un récipient clos dans lequel on fait circuler un léger courant d'azote. Dans ce cas, à la fin de l'expérience, avant d'entreprendre les dosages, les tissus sont dégazés plusieurs fois.

Après six jours on constate qu'il s'est produit, au cours du traitement, des gains en azote total variables d'un échantillon à l'autre mais pouvant atteindre 20 % de la teneur initiale.

Il y a donc bien, semble-t-il, dans les conditions expérimentales définies, fixation d'azote gazeux.

Pour obtenir une confirmation supplémentaire nous avons repris l'expérience précédente avec de l'azote isotopique 15.

Le gaz utilisé, avait la composition suivante :

Teneur isotopique	34,5 % d'N 15
Teneur en azote total	99,5 %
Teneur en oxygène	0,2 %
Teneur en oxydes d'azote	0,3 %

Les fragments d'organes sont placés dans un dessiccateur où l'on introduit l'azote 15. L'expérience dure cinq jours puis les échantillons sont minéralisés soit directement (Kjeldahl), soit après le traitement préconisé par Joldbauer.

L'analyse des solutions minéralisées effectuée au spectromètre de masse a donné les résultats suivants exprimés en pourcentage d'azote 15 par rapport à l'azote total (*tableau 20*).

Méthode	Kjeldahl	Joldbauer
Échantillon 1	0,705 %	1,5 %
Échantillon 2	0,785 %	0,85 %
La teneur naturelle en azote 15 de l'azote normal est de 0,370 %.		

Tableau 20. — Teneur en % d'azote 15 par rapport à l'azote total des fragments de betterave soumis à l'action de l'azote 15.

Il y a donc bien, on le voit, gain d'azote des organes ayant séjourné dans l'azote 15 puisqu'ils renferment en ce cas une quantité d'isotope 15 nettement supérieure (au moins double) à la teneur naturelle.

D'autre part, la comparaison des chiffres donnés par les deux méthodes de minéralisation indique qu'une partie de l'azote fixé est engagée dans la fraction protidique, amidée, aminée, ou ammoniacale tandis qu'une autre l'est sous forme de nitrate ou de nitrite. En effet, les chiffres obtenus par la méthode de Joldbauer sont toujours supérieurs à ceux qui correspondent à la technique de Kjeldahl.

Cet ensemble de résultats montre qu'il se produit en atmosphère d'azote, c'est-à-dire en anaérobiose telle qu'on la conçoit généralement, un passage de la vie ralentie à la vie active. Les observations cytologiques et les dosages chimiques indiquent qu'il y a hyperactivité cellulaire et augmentation de la masse de substance vivante. Les gains sont trop importants pour être expliqués directement par la multiplication au sein des tissus du nombre de bactéries ; il semble plus vraisemblable de penser que, dans le cadre de cette expérience, les micro-organismes pourraient participer aux processus qui aboutissent à l'entrée de l'azote gazeux dans le métabolisme de la plante supérieure.

IV. — ÉTUDE DE LA RACINE TUBÉRISÉE DE CAROTTE

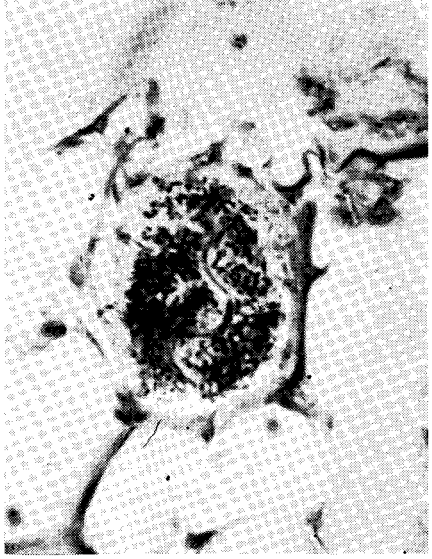
Nous avons ici encore cherché à multiplier le nombre de micro-organismes dans les organes étudiés. Nous y sommes parvenus en immergeant au moins pendant sept jours les racines (stérilisées en surface par le sublimé et flambage) dans un bouillon nutritif stérile contenu dans un Erlenmeyer à large col. Pour être certain de la stérilité externe des organes, on garde seulement, pour la cytologie, les racines qui n'ont pas provoqué la pollution du bouillon.

Nous prélevons les fragments, à inclure et colorer comme ci-dessus, à trois niveaux différents depuis le collet jusqu'à l'extrémité radiculaire et, en chacun de ces cas, dans trois zones histologiques distinctes : le parenchyme péryclicque tubérisé, la région vasculaire et la moelle.

Dans ce végétal, contrairement à ce que nous avons observé chez la pomme de terre où la répartition était très diffuse, les micro-organismes semblent bien localisés. Ils n'existent ni dans le parenchyme péryclicque ni dans la moelle ; mais par contre (*pl. IX*), ils se trouvent presque exclusivement dans les vaisseaux du bois où ils ont proliféré de façon considérable au point d'occuper souvent totalement la lumière du vaisseau et de faire céder parfois même ses parois. Il faut noter également que dans cette région les méats du parenchyme vasculaire hébergent aussi tellement de bactéries qu'ils en sont quelquefois fortement dilatés.

La comparaison des différents niveaux de prélèvement montre que le nombre de cellules infestées diminue progressivement à mesure que l'on s'éloigne du collet vers le méristème terminal.

Planche IX



Coupes effectuées dans des racines tubérisées de carotte ayant été immergées dans des conditions stériles. Multiplication considérable des bactéries dans les cellules et les espaces intercellulaires.

V. — ÉTUDES BACTÉRIOLOGIQUES ET CYTOLOGIQUES DE JEUNES POUSSÉS DE MAÏS ET DE BLÉ

Au chapitre précédent, nous avons montré que les fruits et notamment les caryopses de blé et de maïs hébergeaient aussi des bactéries. L'étude du comportement de ces micro-organismes au cours des premiers stades de la germination est d'un grand intérêt : elle est susceptible de donner des indications d'ordre physiologique.

Les bactéries pourraient rester dans les cellules du grain qui les héberge, disparaître au moment de la digestion des réserves ou bien migrer dans les organes à mesure qu'ils se développent. Dans ce dernier cas, les micro-organismes ont-ils une localisation particulière dans un organe, un tissu ou un groupe de cellules ?

Enfin, puisque nous l'avons vu, plusieurs espèces bactériennes cohabitent dans les caryopses, comment se répartissent-elles quand la jeune plantule s'est développée ?

Nous disposons, pour commencer l'examen de ces différents problèmes de méthodes éprouvées pour les isollements bactériologiques et les observations cytologiques. Sur ce nouveau matériel nous avons travaillé selon des techniques bactériologiques et cytologiques déjà décrites, à partir de jeunes plantes développées *in vitro* dans des conditions de stérilité externe.

1^o Méthode de stérilisation des caryopses.

La stérilisation externe des semences est indispensable mais elle doit être compatible avec le maintien d'un pouvoir germinatif convenable. Nous avons donc été amené à utiliser certains produits antiseptiques à diverses concentrations, pendant des temps variables. L'efficacité de la stérilisation et le pouvoir germinatif qui en résultaient ont été contrôlés.

L'efficacité de la stérilisation est vérifiée en plongeant après le traitement stérilisateur, les grains un à un dans des tubes renfermant un milieu de culture (A 5) stérile. Nous déterminons pour chaque condition d'action de l'antiseptique les pourcentages de grains n'ayant pas amené la pollution du milieu.

Le pouvoir germinatif est apprécié de façon classique en plaçant les graines sur du papier humide en boîtes de Pétri.

L'hypochlorite de sodium en solution à 3,5 % ne nous a pas paru satisfaisant : il faut prolonger trop longtemps le traitement pour obtenir une stérilité convenable et cela est très préjudiciable au pouvoir germinatif.

Les résultats obtenus avec le sublimé sont exprimés au *tableau 21*, p. 76. On voit que pour le blé, un séjour dans une solution à 0,2 % pendant une demi-heure, en assurant une stérilité absolue conserve au grain un pouvoir germinatif correct.

Pour le maïs il faut prolonger un peu plus longtemps l'immersion dans la même solution pour obtenir des résultats convenables, sans développement de champignons.

Concentr. de sublimé	Blé		Maïs	
	30 minutes		60 minutes	
	P.G. %	St. %	P.G. %	St. %
0,05 %	90	75	83	85
0,1 %	75	95	80	100
0,2 %	60	100	76	100

Tableau 21. — Influence des traitements par le sublimé sur le pouvoir germinatif et la stérilité externe de grains de blé et de maïs.

P.G. = Pouvoir germinatif (nombre de grains germés sur 100)
 St. = Stérilité (pourcentage de « tubes » restés stériles).

2° Germination stérile des grains :

Les caryopses stérilisés sont introduits individuellement, avec les précautions habituelles d'aseptie dans des tubes à essais (20 – 200 mm) contenant 10 ml de milieu de Knop gélosé glucosé et stérilisé par passage préalable à l'autoclave. En quelques jours les grains gonflent et germent ; la jeune plante se développe, à l'abri de tout contact bactérien extérieur, en enfonçant ses racines dans le milieu solidifié. Il est alors possible de prélever stérilement une partie quelconque de cette plante pour la soumettre aux analyses bactériologiques et aux observations cytologiques.

3° Analyses bactériologiques.

Les organes à analyser (caryopses, racines, coléoptiles et feuilles) sont plongés dans une ampoule du microbroyeur de Durel et Sausse. Après broyage on isole et détermine, selon les techniques exposées plus haut, les bactéries qui se sont développées dans le milieu.

Les résultats, donnés aux *tableaux* 22 pour le blé et 23 pour le maïs, montrent que les bactéries présentes dans le grain ont migré dans les jeunes organes de la plante au cours de la germination.

En effet, toutes les espèces isolées des caryopses ont été retrouvées soit dans les racines, soit dans les feuilles. Aucune espèce non présente dans le grain ne fait partie de nos déterminations dans les autres organes : ceci apporte implicitement la preuve de la stérilité externe de nos manipulations et confirme l'origine endogène des micro-organismes.

Pour le maïs on remarque qu'à l'exception du *Bacillus coagulans*, on retrouve les mêmes espèces dans la feuille et la racine avec des fréquences comparables à celles trouvées pour le grain ; ce sont essentiellement : *Bacillus pumilus*, *B. cereus*, *B. subtilis*, *B. licheniformis*.

Si l'on opère à partir de fragments d'organes, on constate qu'aucun niveau de la plante n'est exempt de bactéries et que la migration doit s'effectuer dès les premiers stades de la germination puisque nos analyses sont positives même pour des organes très jeunes.

Pour le blé, le *Bacillus cereus* est l'espèce isolée le plus fréquemment de tous les organes. *Sarcina*, *B. licheniformis*, se trouvent aussi dans toutes les parties de la plante. Par contre *B. coagulans* (cf. blé) et *B. pumilus* présents dans le grain et les feuilles font défaut dans les racines.

Espèces bactériennes	% Fréquence propre à chaque espèce dans		
	Grain	Racine	Coléoptile et feuille
<i>B. cereus</i>	55	59	48
<i>B. licheniformis</i>	25	27	7
<i>Sarcina</i>	5	12	6
<i>B. coagulans</i>	8	0	13
<i>B. pumilus</i>	5	0	13
Divers	2	0	10

Tableau 22. — Blé

Espèces bactériennes	Grain	Racine	Coléoptile et feuille
<i>B. cereus</i>	34	37	40
<i>B. pumilus</i>	35	23	14
<i>B. subtilis</i>	9	6	11
<i>Achromobacter</i>	6	6	9
<i>B. licheniformis</i>	6	14	6
<i>Sarcina</i>	3	9	6
<i>B. coagulans</i>	3	0	3
Divers	6	6	12

Tableau 23. — Maïs

Tableaux 22 et 23. — Fréquences d'isolement de chaque espèce bactérienne à partir du grain et des jeunes pousses de blé et de maïs (les pourcentages de fréquence sont obtenus dans chaque cas à partir de 35 organes).

Il semblerait donc, dans le cadre de nos expériences, qu'il pourrait y avoir migration sélective des micro-organismes au sein des jeunes plantes.

4° Observations cytologiques.

Parallèlement aux analyses bactériologiques nous avons fixé et préparé pour la cytologie des sections d'organes provenant de jeunes plantes développées *in vitro* en conditions aseptiques.

Dans les racines de maïs, nous avons observé des amas intracellulaires peu nombreux constitués de 15 à 20 bactéries noyées dans une masse mucilagineuse. Ils n'ont pas de localisation particulière : nous en avons vu dans le parenchyme cortical, l'endoderme, le péricycle, le parenchyme médullaire et au voisinage des vaisseaux. Nous n'avons cependant pas remarqué de telles colonies dans les coupes effectuées tout à fait à l'extrémité apicale.

Dans les organes aériens de la même plante, les bactéries se présentent, comme précédemment, en amas dans le parenchyme du coléoptile et surtout de la feuille. Il est difficile de donner une valeur quantitative à ces observations mais il semble que les cellules hébergeant les micro-organismes sont moins fréquentes dans les organes aériens que dans les racines.

La situation semble inverse chez le blé : les racines présentent peu de cellules hôtes encore que leur nombre aille en augmentant en direction basipète. Dans les organes aériens les amas bactériens sont plus nombreux et sont surtout localisés dans le parenchyme du coléoptile. Nous en avons également observés dans le parenchyme foliaire.

Il nous a semblé que le nombre de cellules hôtes était plus important lorsque les coupes étaient effectuées dans des coléoptiles jeunes, hauts de 2 cm seulement et non encore percés par la feuille.

5° Migration des bactéries au cours de la germination.

Il résulte des expériences précédentes que l'on peut isoler des bactéries à partir des organes d'une jeune plante développée dans des conditions aseptiques. Ces micro-organismes ne peuvent donc provenir que des caryopses d'où nous avons d'ailleurs isolé les mêmes espèces. Il faut ainsi envisager le passage des bactéries d'une cellule à l'autre soit au moment de la division nucléaire, avant la formation de la membrane, soit postérieurement à celle-ci et à travers elle par un processus qui reste à établir.

Les micro-organismes, les observations cytologiques permettent de le préciser, bien que nettement visibles au sein des cellules n'y sont pas très nombreux. Ils sont réunis en colonies mucilagineuses réparties dans la jeune plante de façon très diffuse.

L'espèce la plus fréquemment isolée dans les deux Graminées étudiées est *Bacillus cereus* ; viennent ensuite *Bacillus licheniformis* pour le blé (surtout dans les racines) et *Bacillus pumilus* pour le maïs.

CHAPITRE IV

Étude dynamique de la population bactérienne dans le tubercule de pomme de terre

Les résultats exposés ci-dessus ont permis de préciser la nature, la situation et le nombre de bactéries hébergées au sein des tissus.

Un important problème cependant reste posé : celui du rôle que pourraient jouer ces micro-organismes dans la vie de la plante hôte.

Si on analyse cette question *a priori* et d'une façon tout à fait théorique, on se trouve placé devant trois possibilités ou hypothèses que nous allons schématiser.

Dans la première, la plus simple, les bactéries n'auraient aucun rôle dans la physiologie de la plante supérieure : elles traverseraient « indifférentes » les diverses étapes du métabolisme de l'hôte sans en subir de conséquence et sans intervenir. D'une certaine façon, elles seraient inutiles et leur présence banale : c'est l'hypothèse de *l'inertie*.

Dans la seconde, les micro-organismes subiraient les modifications biochimiques du milieu où ils vivent. Certaines conditions favorables permettraient aux bactéries de se multiplier, d'autres pourraient leur être défavorables. Les individus hébergés n'auraient néanmoins aucune influence directe ou indirecte sur les mécanismes physiologiques de la plante hôte : c'est l'hypothèse de la *passivité*.

Dans la troisième, enfin, les bactéries participant à la vie de la plante, seraient en outre capables d'intervenir, grâce aux produits de leur métabolisme, dans le déclenchement, le déroulement ou l'inhibition de certains processus physiologiques de l'hôte : c'est l'hypothèse de *l'intervention*.

Certes, en dressant ainsi ce schéma volontairement trop simpliste, nous ne tentons pas de dissimuler les difficultés de l'entreprise. La réalité

est certainement beaucoup plus complexe et nuancée, sans doute y a-t-il tour à tour par exemple, des périodes de *passivité* et d'*intervention*. Quoi qu'il en soit, placé devant un très grand nombre d'expériences possibles, nous avons bien entendu, dans le cadre de ce travail, cherché, en limitant nettement le sujet, à réunir en premier lieu des éléments de base indispensables.

Dans cet esprit nous n'avons dès l'abord retenu qu'un seul végétal : la pomme de terre. D'une part, il est toujours facile de se procurer des tubercules et d'autre part, ce matériel, en raison de son importance économique, a fait l'objet, depuis un certain temps déjà, de travaux relativement nombreux notamment en physiologie, biochimie et agronomie. S'il reste encore bien des mécanismes à éclaircir, ceux de la dormance et de la tubérisation en particulier, l'ensemble des connaissances acquises nous a incité à commencer par cette plante, les recherches sur la nature des rapports entre les bactéries et leur hôte.

En ce domaine l'une des premières questions qui vient à l'esprit est d'ordre quantitatif. Les examens cytologiques, nous l'avons vu, ont montré que le nombre de micro-organismes hébergés, généralement faible, pouvait varier selon la situation et aussi le moment des prélèvements. Toute une partie du présent chapitre sera dominée par ce problème qui, dans l'état actuel de nos recherches, nous semble en effet très important.

Notre premier souci a donc été de chercher une méthode simple permettant de dénombrer les bactéries dans les organes. Nous avons utilisé, nous le verrons, deux techniques différentes.

La première, que nous avons mise au point, paraissait assez approximative mais, en la comparant à la seconde, méthode habituelle de numération en milieu solide, elle a semblé donner des résultats satisfaisants.

Nous avons alors étudié ce que nous avons appelé la *population bactérienne*. Nous l'avons fait pour un très grand nombre de tubercules en nous plaçant successivement à différents points de vue : comparaisons entre différents tissus ou variétés, évolution dans des conditions physiologiques naturelles (germination, végétation, dormance) ou artificielle (levée de dormance, conservation au froid, action de diverses atmosphères, etc...).

I. — MÉTHODES

1° Méthode des explantats en milieu liquide.

Les tubercules à étudier, immergés dans une solution aqueuse de sublimé à 0,2 %, sont ensuite, piqués sur une aiguille emmanchée stérile, plongés à deux reprises dans l'alcool, retirés, et flambés. Chacun d'eux est alors sectionné transversalement en deux moitiés. Les surfaces planes ainsi obtenues, où vont être effectués les prélèvements, sont soigneusement passées à la flamme. Puis on fait pénétrer dans les tissus en prenant les précautions habituelles d'asepsie, un emporte-pièce cylin-

drique qui permet de prélever un explantat ayant 4 mm de diamètre et environ 20 mm de longueur (1). Celui-ci est immédiatement introduit dans un tube à essais contenant 8 à 10 ml d'un milieu de culture de composition suivante (A 5) :

Glucose	20	g
« Lab Lemco » beef extract (Oxoid)	10	g
Peptone Oxoid L. 37	10	g
Chlorure de sodium	5	g

Le milieu réparti en tube à essais de 20 × 200 mm a été préalablement stérilisé vingt minutes à 120° C.

Entre deux prélèvements l'emporte-pièce est passé à la flamme et refroidi dans un bain d'alcool.

Les tubes correspondant à une série de prélèvements sont mis à incuber à 30° C à l'étuve bactériologique.

Dès le second jour le contenu d'un certain nombre de tubes se trouble et un voile apparaît parfois en surface ; ces observations traduisent le développement des bactéries dans le bouillon : nous disons dans ce cas que, la *réponse* est *positive*.

Généralement après quatre jours le nombre de tubes pollués ne varie plus. Nous déterminons alors le pourcentage de réponses positives par rapport au nombre de prélèvements mis à incuber. Nous avons considéré que ce chiffre permet d'évaluer approximativement et comparativement, la population bactérienne dans les séries de tubercules étudiés.

Une série d'expériences préliminaires réalisée sur des tubercules de taille sensiblement identique et provenant tous d'un même lot, a permis de préciser qu'il fallait effectuer un total d'au moins 60 explantats dans 6 tubercules différents pour aboutir à une reproductibilité suffisante. Comme dans tous travaux de ce genre à partir d'une certaine limite il faut multiplier considérablement le nombre d'expériences pour obtenir un faible gain de précision. Nous avons donc choisi un nombre d'explantats qui, tout en donnant une précision convenable, pouvait cependant être effectué en un temps raisonnable (2).

L'aspect extérieur du développement bactérien est variable d'un tube à l'autre ce qui révèle la présence d'espèces différentes ; nous n'en avons pas tenu compte et avons toujours dénombré globalement les réponses positives.

Dans les conditions expérimentales décrites ce sont les bactéries hébergées par les cellules du pourtour de l'explantat, blessées par le passage de l'emporte-pièce, qui sont à l'origine du trouble révélateur de leur présence.

(1) Cette technique est analogue à celle qui a été préconisée par WHITTE et décrite par GAUTHERET (1959) pour obtenir des tranches stériles d'organes charnus en vue de la culture de tissus.

(2) On trouvera au chapitre VII, p. 155 une analyse critique de cette méthode.

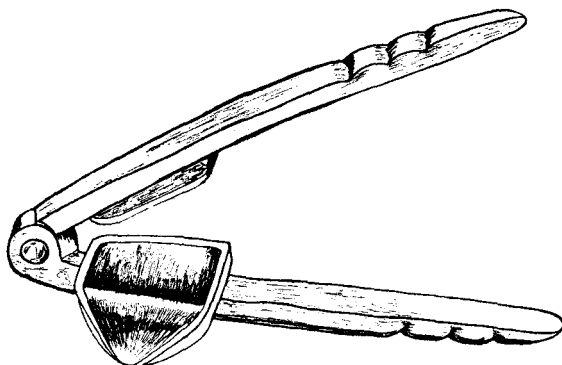


FIG. 5. — Pince spéciale utilisée pour écraser les tissus végétaux.

2^o Méthode de numération en milieu solide.

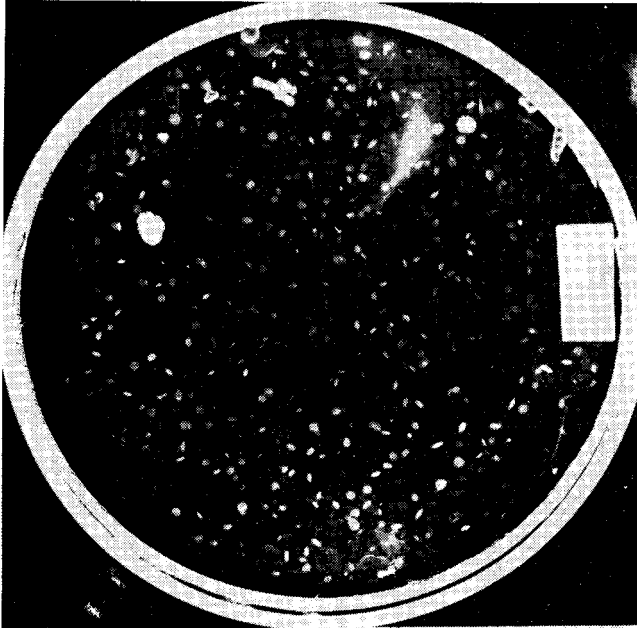
En salle stérile on prélève dans les tubercules à étudier, comme dans la méthode précédente, un explantat cylindrique (1) qui est écrasé dans une pince à mors spéciale (*fig. 5*,). Le jus d'expression est recueilli directement sans dilution dans une boîte de Pétri préalablement stérilisée au four Pasteur. On y verse, en agitant, 70 ml d'un milieu tryptosé gélosé (A 29) rendu liquide par chauffage à 50° C. Après solidification du milieu on recouvre de gélose blanche (A. 30) stérile pour éviter l'étalement des colonies en surface. On porte les boîtes à incuber à l'étuve à 30° C pendant soixante-douze heures ; ce temps écoulé on élimine la pellicule de gélose blanche et compte les colonies. Elles se présentent sous forme de lentilles biconvexes de 2 à 4 mm de diamètre et sont orientées (*pl. X*) très diversement dans l'épaisseur du milieu de culture.

II. — LOCALISATION DES BACTÉRIES DANS LES DIFFÉRENTS TISSUS DES TUBERCULES

En 1951, HOLLIS, dont nous avons ci-dessus relaté les travaux s'est intéressé à cette question : il distinguait dans les tubercules d'un lot

(1) Les explantats sont toujours effectués avec le même emporte-pièce : ils mesurent 5 mm de diamètre et 15 mm de longueur. Ce volume relativement constant correspond à un poids frais d'environ 0,7 g. et un poids sec d'environ 0,15 g.

Planche X



1



2

Dénombrement des bactéries en milieu solide

1 : A partir de tubercules normaux.

2 : A partir de tubercules immergés dans une solution de sublimé
(cf. p. 110).

homogène de la variété Bliss Triumph, quatre régions différemment vascularisées, y effectuait des prélèvements et étudiait le nombre de bactéries hébergées. Il trouvait par une méthode très voisine de celle que nous avons exposée, des pourcentages d'ensemencements féconds portés au *tableau 24*.

Nature du tissu	Vascularisation	Ensemencements féconds %
Tissu cortical	faible	5,3 %
Anneau vasculaire.	élevée	4,9 %
Liber interne + moelle centrale	moyenne	2,7 %
Moelle centrale	très faible	5,3 %

Tableau 24. — (D'après HOLLIS) Pourcentages d'ensemencements féconds à partir de prélèvements effectués dans différents tissus.

Ces chiffres sont extrêmement voisins les uns des autres ; ayant opéré environ 600 explantats, l'auteur en a conclu que la répartition des bactéries au sein des tubercules était pratiquement uniforme.

De notre côté, après avoir, par la cytologie, reconnu de même qu'il ne semblait pas exister de différences importantes dans le peuplement des différents tissus, nous avons entrepris une étude de la localisation.

Pour cela nous avons effectué dans chaque tubercule d'une série qui en comportait 6

- 6 explantats dans la zone périphérique qui, étant donné le diamètre de l'emporte-pièce, comprend la zone corticale, l'anneau vasculaire et le liber interne ;
- 6 explantats dans la zone centrale, c'est-à-dire la moelle.

Nous avons ainsi réalisé à des moments différents de l'année 19 séries de prélèvements, soit près de 1.400 explantats.

Au total on note que les ensemencements féconds représentent environ 12 % des explantats pratiqués dans la périphérie et 14 % pour les prélèvements effectués dans la région centrale.

Ces chiffres sont eux aussi très voisins l'un de l'autre et ils confirment donc les résultats acquis par HOLLIS : tous les tissus du tubercule peuvent héberger des bactéries.

Toutefois, si au lieu de considérer le résultat global on établit les pourcentages par périodes de deux à trois mois on remarque (*fig. 6, p. 84*) qu'il y a des modifications dans la répartition des micro-organismes :

- pendant la période qui précède la germination (février, mars, avril) il y a davantage de bactéries à la périphérie (13,5 %), qu'au centre (7,3 %) ;

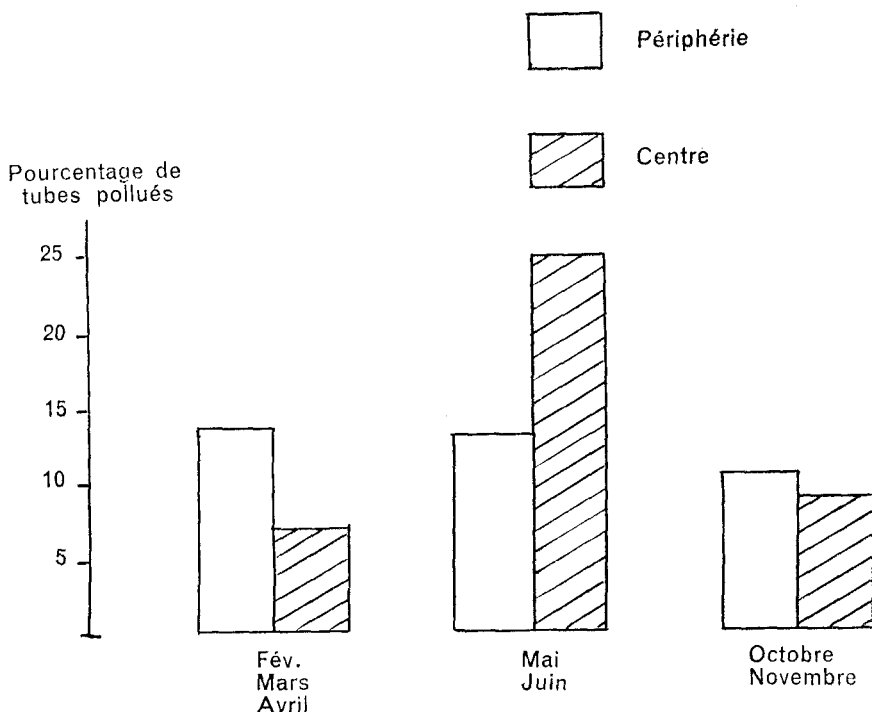


FIG. 6. — Présence comparée des bactéries dans le centre et la périphérie des tubercules de pomme de terre. Variations avec l'époque de prélèvement.

— dans des tubercules nouveaux fraîchement récoltés (mai et juin), ces résultats s'inversent : si la population en périphérie n'est pas modifiée (12,5 %) celle du centre, par contre, augmente nettement (25 %) ;

— la richesse de ces deux zones est à peu près égale en octobre et novembre (9,4 % en périphérie et 8,9 % au centre).

III. — ÉTUDE DES BACTÉRIES PRÉSENTES DANS DES TUBERCULES D'UNE MÊME VARIÉTÉ CULTIVÉE DANS DES SOLS DIFFÉRENTS

La plupart des micro-organismes isolés sont communs dans le sol. Ceci bien entendu, pose l'intéressante question de l'origine de ces bactéries.

Notons à ce sujet, mais sans sortir du cadre de ce chapitre, que si la proximité du sol peut fournir une explication à la présence des bactéries dans les organes souterrains, cela est plus difficile à admettre pour les caryopses et bien plus encore pour l'embryon. L'existence de micro-organismes à l'intérieur de cet organe, aboutissement d'une génération et naissance d'une autre, est assez surprenante. Les bactéries se transmettraient-elles par son intermédiaire ? Constatons, en tout cas, que les espèces isolées des organes aériens (caryopses, embryons) n'en sont pas spécifiques : on les rencontre également dans les organes souterrains.

Les organes tubérisés sont directement en contact avec le sol et l'on peut imaginer que les bactéries isolées des tubercules de pomme de terre, par exemple, auraient pu pénétrer dans la plante, pendant la période de végétation par des microblessures du système racinaire ou des lenticelles.

Aussi avons-nous entrepris de comparer la nature des bactéries présentes : d'une part, dans une même variété cultivée dans des sols différents et, d'autre part, dans des variétés diverses développées dans un même sol.

Nous avons rassemblé des tubercules de la variété Bintje cultivées dans des régions très différentes : Aisne, Ardennes, Douaisis, Hesdinois, Littoral du Nord, Oise, Pays de Caux, Pévèle, Somme.

Pour chacune de ces régions nous avons retenu 36 tubercules dans chacun desquels nous avons effectué 6 explantats. Cela aboutit donc à 216 explantats qui nous ont permis d'isoler environ 40 à 60 colonies par lot.

Les résultats des déterminations sont donnés au *tableau 25*, p. 86.

On constate que *Bacillus cereus* est présent dans tous les lots. Cette espèce, par rapport à l'ensemble de celles qui ont été isolées, représente environ 50 % pour l'Aisne et le Pévèle, 40 % pour le Littoral du Nord, le pays de Caux, la Somme et l'Oise ; 30 % pour l'Hesdinois, le Douaisis et les Ardennes.

Viennent ensuite 3 autres espèces : *Bacillus subtilis*, *B. licheniformis* et une espèce non déterminée B. F. qui ne font défaut chacune que dans un seul lot.

L'ensemble de ces 4 espèces représente toujours, quelles que soient les régions, un pourcentage moyen de 75 % atteignant parfois 90 % (Littoral du Nord).

Il faut noter également quelques résultats particuliers : *Sarcina* est fréquent dans les tubercules du Douaisis ; *B. polymyxa* ne se rencontre que dans l'Hesdinois et la Somme ; *B. sphaericus* ne figure que dans le lot provenant de l'Oise.

On constate donc qu'il existe, suivant les régions de culture, quelques petites différences dans la nature des espèces bactériennes isolées. Les variations entre les lots ne sont pas suffisamment nettes pour appuyer l'hypothèse unique d'un passage des bactéries du sol dans les tubercules.

Espèces de Bactéries isolées	Origine								
	Aisne	Ardennes	Douais	Hesdinois	Littoral du Nord	Oise	Pays de Caux	Pévèle	Somme
<i>B. subtilis</i>	1	3	4	2	6	2	5	5	8
<i>B. licheniformis</i>	10	11	1	8	7	5		6	6
<i>B. pumilus</i>			2	3		1			
<i>B. cereus</i>	21	17	29	22	19	21	21	24	19
<i>B. coagulans</i>	3	9		2		4			1
B. F.		12	6	2	6	3	9	3	5
B. J.	5		2	2			1	2	
<i>B. polymyxa</i>				5					4
<i>B. sphaericus</i>						3			
<hr/>									
<i>Achromobacter</i>	1	5	2	6	2	7	1	4	
<i>Sarcina</i>	1		14		2			5	
<hr/>									
Nombre de tubes pollués.	41	53	58	50	40	43	40	47	41
Nombre de colonies isolées.	42	57	60	53	42	46	40	49	43
Nombre de souches isolées.	7	7	8	9	6	8	5	7	6

Tableau 25. — Répartition des principales espèces bactériennes isolées de tubercules de variété Bintje cultivées dans différentes régions.

IV. — ÉTUDE DES BACTÉRIES PRÉSENTES DANS DES TUBERCULES DE VARIÉTÉS DIFFÉRENTES CULTIVÉES DANS UN MÊME SOL

Nous avons planté les 4 variétés indiquées au *tableau 26*, p. 87, côte à côte dans le même sol et avons effectué la récolte des tubercules fils à des dates portées dans le tableau et en rapport avec les caractères de la variété.

Variété	Caractère	Origine	Récolte
Saskia . . .	hâtive	Pévèle	2 juillet
Viola . . .	hâtive à mi-hâtive	Finistère	13 août
Bintje . . .	demi-hâtive	Hollande	13 août
Roseval . .	demi-tardive	Finistère	27 septembre

Tableau 26. — *Etude des bactéries présentes dans diverses variétés de pomme de terre.*

Pour étudier les bactéries, nous avons eu recours à la technique des explantats en milieu liquide déjà décrite. La récolte de chaque variété était divisée en 5 lots correspondant à 5 emplacements différents dans le champ de culture.

Les résultats sont donnés au *tableau 27, p. 88*, où figurent les noms des espèces bactériennes isolées pour chacun des 5 lots de chaque variété. On constate qu'il n'existe au point de vue bactériologique, pour une même variété que très peu de variations relatives d'un lot à l'autre. Si l'on compare, d'autre part, le peuplement des diverses variétés, on remarque qu'il y a aussi une certaine régularité dans les résultats. C'est *Bacillus cereus* qui est de loin le plus fréquemment isolé de toutes les variétés puisqu'il représente :

- 86 % des isoléments pour la variété Saskia,
- 68 % — Viola,
- 80 % — Bintje,
- 75 % — Roseval.

C'est la souche B. F. qui vient en deuxième position dans la fréquence des isoléments. Les autres espèces : *Bacillus licheniformis*, *B. subtilis*, *B. sphaericus*, ne figurent dans cet essai qu'avec des fréquences faibles.

Il semble donc que les résultats obtenus à partir de 4 variétés différentes soient assez homogènes et ne permettent pas de conclure à l'existence d'une flore particulière à l'une d'entre elles.

V. — ÉTUDE DE L'ÉVOLUTION DU NOMBRE DES BACTÉRIES DANS LES TUBERCULES EN COURS DE VÉGÉTATION

Des pommes de terre de la variété Bintje ont été plantées le 15 avril par les soins de la Fédération Française des Producteurs de pomme de terre en son champ expérimental de Carvin (Pas-de-Calais). A partir du 9 mai, nous avons chaque semaine récolté une douzaine de pieds et effectué une série de 72 explantats (36 au centre, 36 à la périphérie) dans 6 tubercules différents dont nous avons étudié la population bactérienne par la méthode des explantats en milieu liquide. Les expériences

n'ont pu être poursuivies que jusqu'au 13 juin : en effet, à partir de cette date l'état des tubercules ne permettait plus d'y opérer convenablement les prélèvements.

		Nombre de tubes pollués	<i>Bacillus cereus</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>B. licheni- formis</i>	B. F.	<i>B. sphaericus</i>	Divers
Saskia	- S1	21	20					1
	S2	28	26			1		1
	S3	11	19					
	S4	35	28		4		2	1
	S5	29	22		1	6		1
Totaux		124	105	0	5	7	2	4
Viola	- V1	28	21		3	3	1	4
	V2	23	12	1	2	8	2	8
	V3	19	13		1	5	0	5
	V4	18	13			5		4
	V5	31	22	1	1	7	1	7
Totaux		119	81	2	7	28	4	28
Bintje	- B1	26	14	2		8		10
	B2	13	10		1	2	1	2
	B3	33	30	1		3		4
	B4	32	26			6		6
	B5	28	24	1	1	2		2
Totaux		132	104	4	2	21	1	24
Roseval	- R1	26	17			7	4	6
	R2	35	30			6	1	3
	R3	24	17	1		6		5
	R4	25	19		2	3	2	
	R5	18	13	2		3		1
Totaux		128	96	3	2	25	7	15

Tableau 27. — *Isolements de diverses espèces bactériennes à partir de quatre variétés de pomme de terre.*

Il y a (*fig. 7*), en cours de végétation, une augmentation importante du nombre de bactéries ; cependant, dans le cadre de nos expériences, ce phénomène ne semble pas tout à fait régulier car il se produit, assez brutalement, la quatrième semaine, une diminution importante mais passagère du nombre des bactéries

Pourcentage
de
tubes pollués

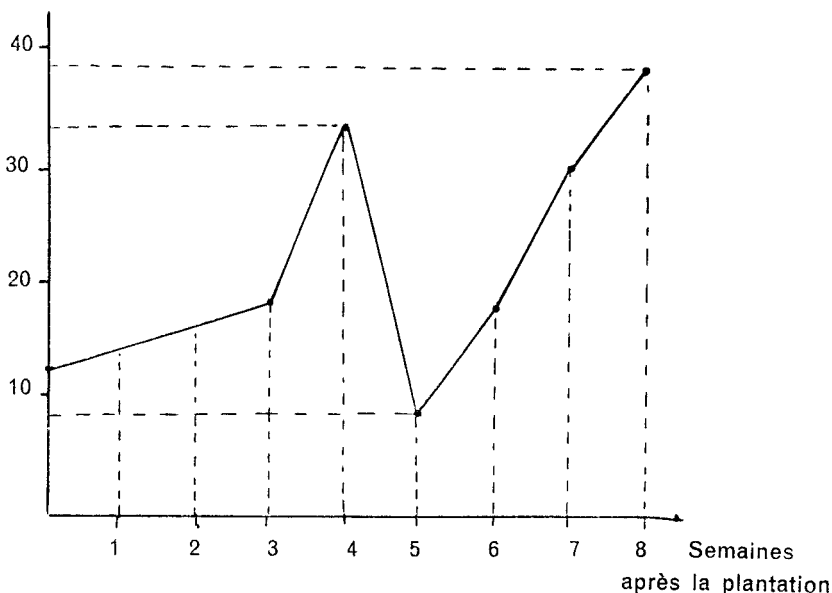


FIG. 7. — Variation du nombre de bactéries dans les tubercules mères en cours de végétation.

Il semble tout à fait vraisemblable, si l'on établit un rapport glucides-bactéries, qu'au début du cycle végétatif, au moment où l'amidon du tubercule-mère subit une hydrolyse intense, il y ait prolifération des bactéries consécutive à l'apport d'éléments nutritifs. Cette augmentation de la teneur glucidique au sein des tubercules ne dure pas très longtemps : 26 à 40 jours après la plantation suivant les variétés. DENNY (1929), a montré qu'elle était suivie d'une nette diminution qui pourrait, dans nos travaux, avoir quelque rapport avec l'affaiblissement passager de la population bactérienne. Ce dernier coïncide d'ailleurs aussi avec l'apparition des premiers tubercules fils sur les stolons, quatre à cinq semaines après la plantation. Quoi qu'il en soit, après cette période, le nombre de bactéries augmente très nettement et régulièrement depuis la sixième semaine jusqu'à la huitième qui marque la fin de nos expériences.

VI. — ÉTUDE DE LA POPULATION BACTÉRIENNE PENDANT LA PÉRIODE DE CONSERVATION HIVERNALE

1° Conservation « naturelle » à une température proche de 15° C.

Lorsque nous avons, à la fin de 1961, réalisé nos isollements à partir des tubercules de pomme de terre en vue de la détermination des espèces hébergées, nous avons pris soin de noter la proportion de *réponses positives* correspondant à chaque série d'explantats. Ces dernières étaient effectuées à partir d'un même lot de pomme de terre mais nécessairement à des dates différentes (de novembre à février). Nous avons été surpris, à l'examen des résultats de constater que ces proportions de *réponses positives* variaient beaucoup (de 1 à 7) avec la date des prélèvements (tableau 28).

Date des prélèvements des explantats	Nombre d'explantats effectués	Nombre de tubes pollués	Pourcentage de tubes pollués
1 au 15 XI 61.	288	29	10 %
16 au 30 XI	312	36	11,5 %
1 au 15 XII	112	38	33,9 %
16 au 31 XII	168	115	68,4 %
1 au 15 I 62.	240	170	70,8 %
16 au 31 I 62.	234	145	61,9 %
1 au 15 II	168	41	24,4 %
15 au 28 II	82	10	12,2 %

Tableau 28. — Variations du nombre de tubes pollués en fonction des dates de prélèvement (1961-1962).

Pendant la durée de ce travail (nov. à fév.) le matériel végétal subit évidemment une évolution importante. On sait en effet qu'après la période de dormance les tubercules peuvent, si les conditions extérieures de température, d'humidité et d'éclaircissement sont convenables, commencer à émettre des bourgeons. Aussi avons-nous envisagé l'existence possible de répercussions réciproques entre le métabolisme de la plante et celui des bactéries. Pour le vérifier nous avons pendant les années qui suivirent repris systématiquement ces expériences.

Expérience 62-63 :

Pour être sûr de l'homogénéité de notre matériel nous avons, en 1962, cultivé en un même lieu, des pommes de terre de la variété Bintje, supprimé en cours de végétation les pieds atteints de maladie à virus et conservé des tubercules de calibre homogène pour éliminer, dans la mesure du possible les différences d'état physiologique.

Les tubercules, récoltés dans la deuxième quinzaine de septembre ont été entreposés dans un local exposé au nord où la température, à partir du mois d'octobre, est restée voisine de 15° C.

Les prélèvements ont été effectués tous les quinze jours environ. Chaque série comprend 10 tubercules dans chacun desquels on pratique 6 explantats.

Pour exprimer l'évolution du bourgeonnement (encore appelé germination), nous ôtons les bourgeons ou germes qui ont poussé sur les 10 tubercules et déterminons leur poids frais.

On voit (*tableau 29*) que les résultats concordent avec ceux que nous avons obtenus l'année précédente (*tableau 28*) : le nombre de micro-organismes varie notablement au cours de la période expérimentale.

Date de prélèvement des 60 explantats	Nombre de tubes pollués	Pourcentage	Poids frais des germes en g
2 XI 62.	5	8,3 %	0
17 XI	6	10 %	0,36
4 XII	10	16,6 %	1,14
17 XII	41	68,3 %	2,43
3 I 63.	25	41,6 %	5,12
14 I	18	30 %	8,08
1 II	15	25 %	8,25

Tableau 29. — Variations du nombre de tubes pollués en fonction des dates de prélèvement (1962-1963).

Expériences 63-64 :

A nouveau, pour la troisième fois, en 63-64 nous avons repris ces travaux mais en utilisant cette fois, la technique des dénombrements en milieu solide telle que nous l'avons décrite plus haut.

Nous avons entreposé dans les mêmes conditions de conservation que l'année précédente des pommes de terre de plant calibré de la variété Bintje (classe A) que nous nous sommes procuré dans le commerce.

Chaque semaine, du 30 octobre 1963 au 15 janvier 1964, on prélève 6 tubercules à partir desquels on effectue les dénombrements de bactéries (1). Evidemment au cours de cette période les tubercules commencent à germer : nous les laissons évoluer naturellement.

Les résultats figurent au *tableau 30, p. 92.*

(1) Nous rappelons que les chiffres de la colonne « nombre de colonies » se rapportent au jus résultant de l'expression d'un explantat dont le poids frais est d'environ 0,7 g. (voir p. 82).

Date des prélèvements		Nombre de colonies dans chaque boîte de Pétri						Moyenne
30	X 63	5.	8.	17.	4.	0.	3.	6
4	XI	33.	14.	41.	22.	18.	29.	26
12	XI	57.	84.	13.	49.	60.	65.	54
18	XI	31.	118.	89.	94.	132.	114.	96
25	XI	118.	83.	62.	97.	103.	109.	95
2	XII	142.	110.	78.	101.	75.	112.	103
9	XII	135.	91.	107.	111.	119.	122.	114
16	XII	158.	127.	120.	79.	94.	117.	115
30	XII	86.	104.	98.	121.	96.	139.	107
8	I 64	113.	75.	78.	96.	109.	67.	89
15	I	63.	82.	54.	41.	78.	42.	60

Tableau 30. — Variations du nombre de bactéries hébergées par les tubercules de pomme de terre en fonction des dates de prélèvement.

Ici encore les résultats concordent avec ceux des années précédentes. Nous avons réuni les résultats des trois années sur un même graphique (*fig. 8*) où est également tracée la courbe de gain de poids des germes correspondant à la seconde expérience.

De l'examen de ce graphique il ressort nettement :

— que la population bactérienne s'accroît de façon importante (de 1 à 7) au sein des tubercules pendant le mois de décembre, c'est-à-dire, dans les conditions expérimentales définies, deux à trois semaines environ après le moment où les bourgeons commencent à se développer

— qu'en janvier, alors que la poussée des bourgeons est très active, le phénomène précédent s'inverse. Le nombre de bactéries au sein des cellules diminue nettement.

Ainsi donc ces expériences, répétées pendant trois années consécutives, par conséquent sur des récoltes dissemblables, par deux méthodes différentes, établissent bien que le nombre de micro-organismes hébergés est susceptible de variations importantes en particulier au moment du bourgeonnement des tubercules pendant la période hivernale.

Préciser les résultats exposés au chapitre précédent fut notre objectif suivant. Nous voulions savoir si, en intervenant pour modifier le déroulement de la germination, il y aurait des répercussions quantitatives sur la population bactérienne des tubercules.

On parvient à retarder le bourgeonnement des tubercules par divers procédés, nous avons retenu :

- un agent physique : le froid, couramment utilisé pour la conservation du plant de pomme de terre ;
- un agent chimique : inhibiteur de germination, l'isopropyl-phényl-carbamate.

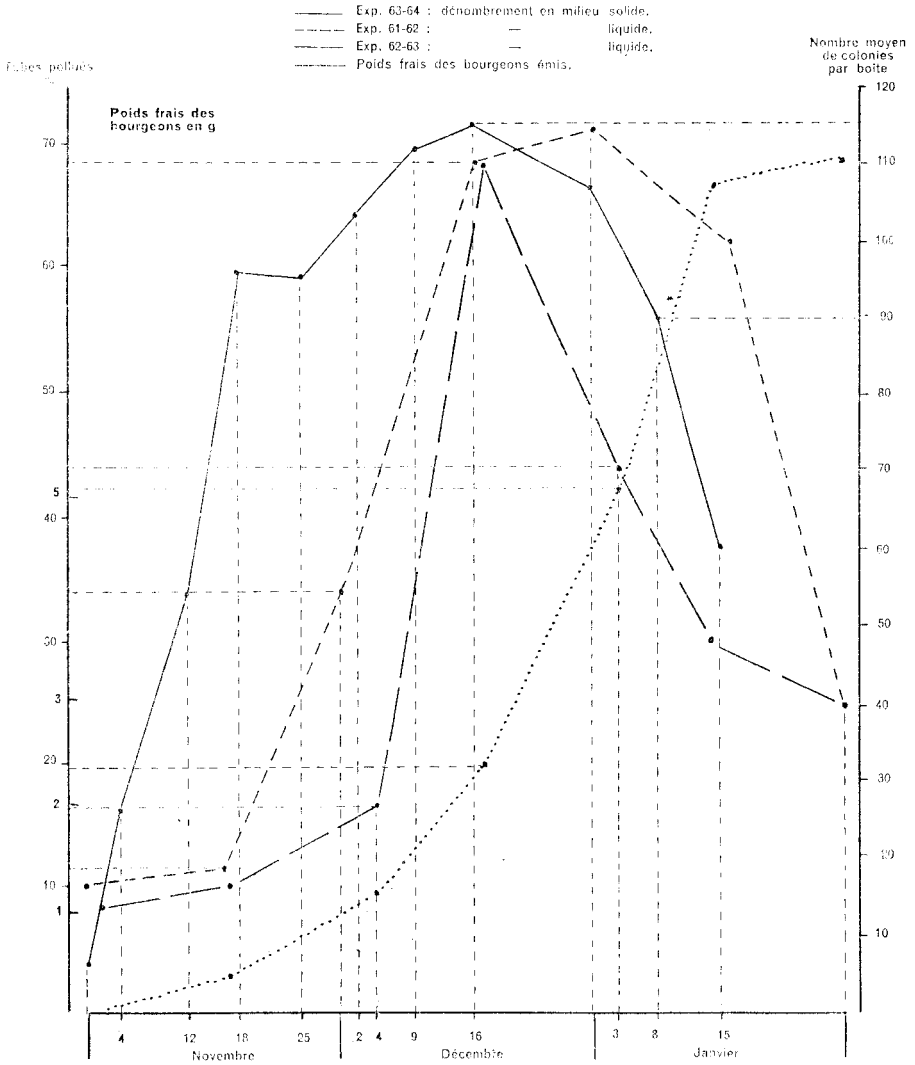


FIG. 8. — Variations de la population bactérienne au cours de la conservation « naturelle » de tubercules de pomme de terre. Résultats d'ensemble. Comparaison.

Dans chacun de ces cas, nous avons, au cours de deux années consécutives, effectué deux répétitions des mêmes expériences en utilisant chacune des deux méthodes de dénombrement des bactéries :

- en 62-63 méthode des explantats en milieu liquide ;
- en 63-64 dénombrement en milieu solide.

2° Conservation « artificielle » par le froid :

L'origine des tubercules est la même que dans l'expérience précédente.

Nous divisons au départ notre matériel en deux lots :

— le premier subit le froid continu : il séjourne dans une armoire frigorifique réglée à 4°-6° C pendant toute la durée de l'expérience de novembre à février. Il n'y a dans ce cas aucune émission de bourgeons

— le second lot reste au froid, comme le premier, pendant une période initiale qui va du début de novembre jusqu'au début de janvier. Puis il est placé à 15° C. Dans ces conditions les tubercules commencent à germer environ quinze jours après leur sortie de l'armoire frigorifique.

A) FROID CONTINU.

— *Expériences 62-63 : dénombrements en milieu liquide.*

Nous n'avons effectué que quatre séries d'explantats dont les résultats sont donnés au *tableau 31*.

Date de prélèvement des 60 explantats	Nombre de tubes pollués	Pourcentage
2 XI 62.	5	8,3 %
3 I 63.	16	27 %
19 I	31	52 %
2 II	36	60 %

Tableau 31. — *Conservation au froid continu. Variation du nombre de tubes pollués en fonction des dates de prélèvement.*

Date des prélèvements	Nombre de colonies dans chaque boîte de Pétri							Moyenne
30 X 63	5.	8.	17.	4.	0.	3.		6
4 XI	4.	0.	9.	0.	11.	8.		5
12 XI	10.	2.	9.	14.	6.	15.		9
18 XI	14.	12.	0.	15.	6.	3.		8
25 XI	8.	13.	21.	15.	9.	4.		11
2 XII	19.	24.	7.	11.	12.	15.		14
9 XII	18.	21.	10.	18.	7.	19.		15
16 XII	31.	14.	11.	9.	22.	14.		16
30 XII	23.	29.	19.	37.	41.	45.		32
8 I 64	29.	52.	40.	61.	47.	22.		41
15 I	35.	62.	54.	71.	61.	55.		57

Tableau 32. — *Conservation au froid continu. Variation du nombre de bactéries hébergées par les tubercules de pomme de terre en fonction des dates de prélèvement.*

— *Expérience 63-64* : dénombrements en milieu solide.

Pour préciser les résultats ci-dessus nous avons effectué toutes les semaines du 30-X-62 au 15-I-63, des numérations qui ont donné les chiffres indiqués au *tableau 32*, p. 94.

B) FROID INTERROMPU.

— *Expériences 62-63* : dénombrements en milieu liquide.

La sortie de l'armoire frigorifique a eu lieu le 3-I-63. Résultats au *tableau 33*.

Date de prélèvement des 60 explantats	Nombre de tubes pollués	Pourcentage
2 XI 62.	5	8,3 %
3 I 63 (sortie du froid)	16	27 %
19 I	55	92 %
2 II	10	16,6 %

Tableau 33. — *Conservation au froid interrompu. Variation du nombre de tubes pollués en fonction des dates de prélèvement.*

— *Expérience 63-64* : dénombrements en milieu solide.

Les dénombrements effectués après le 3-I-64 (sortie de l'armoire frigorifique) sont rapportés au *tableau 34*.

Date des prélèvements	Nombre de colonies dans chaque boîte de Pétri	Moyenne
16 XII 63	31. 14. 11. 9. 22. 14.	16
30 XII	23. 29. 19. 37. 41. 45.	32
3 I 64	Sortie de l'armoire frigorifique	
13 I	127. 105. 86. 124. 151. 70.	110
20 I	87. 54. 72. 92. 67. 84.	76

Tableau 34. — *Conservation au froid interrompu. Variation du nombre de bactéries hébergées par les tubercules de pomme de terre en fonction de la date de prélèvement.*

L'ensemble de ces résultats, traduit graphiquement aux *fig. 9* et *10* p. 96 montre que :

a) il existe une très bonne concordance entre les deux expériences entreprises sur des récoltes et par des techniques de dénombrement différentes :

- explantats en milieu liquide, *fig. 9*, exp. 62-63 ;
- dénombrements en milieu solide, *fig. 10*, exp. 63-64.

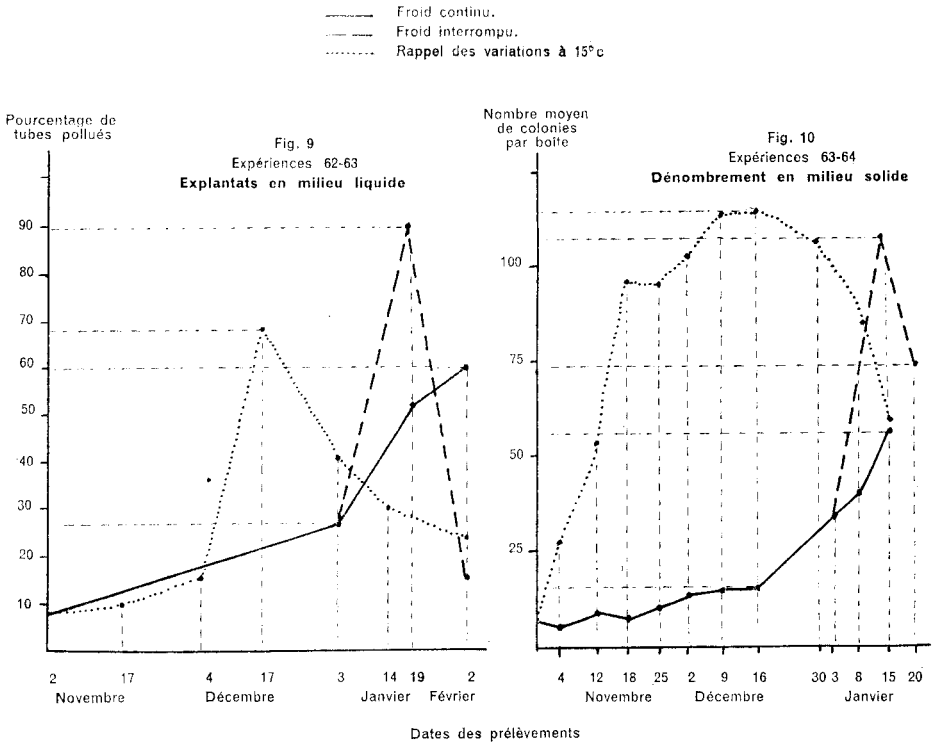


FIG. 9 et 10. — Influence du séjour à 4° C sur les variations de la population bactérienne au sein des tubercules de pomme de terre.

On constate, en effet, que les phénomènes enregistrés sont bien de même nature dans l'un et l'autre cas ;

b) la conservation au froid continu (4°-6° C) retarde de 30 à 45 jours environ l'augmentation du nombre de bactéries au sein des tubercules ; mais, fait remarquable, elle ne l'empêche pas.

Les micro-organismes hôtes peuvent donc se développer à la température de l'armoire frigorifique, mais naturellement plus lentement qu'à 15° C (1). Par conséquent, même en l'absence de signes extérieurs de germination l'élévation du nombre de bactéries mise en évidence à 15° C se produit néanmoins ;

(1) Ce fait n'est pas particulièrement étrange : le développement de bactéries à basse température est bien connu des bactériologistes alimentaires qui qualifient ces micro-organismes du nom de psychotrophes, ils sont capables par exemple de se développer à la surface de la viande entreposée à 4° C en salle frigorifique. (Colloque de microbiologie alimentaire, Lille, sept. 1964).

c) si l'on fait cesser l'action du froid au début du mois de janvier, les tubercules commencent à germer et il se produit en même temps une augmentation importante ($\times 4$), brutale (8 à 15 jours) mais fugace du nombre de micro-organismes hébergés.

3° Germination retardée par un inhibiteur chimique :

Dès le début de novembre, nous avons saupoudré 10 kg de tubercules avec 20 g d'un produit qui contient 4 % d'isopropyl-phényl-carbamate, puis nous les avons conservés à 15° C. Dans ces conditions le bourgeonnement est considérablement retardé ; à la fin de l'expérience, en janvier, on n'enregistre qu'un faible gonflement des yeux.

Les résultats sont donnés comme ci-dessus. En 1962-63, nous avons utilisé la technique des explantats en milieu liquide (*tableau 35*), en 1963-64 la méthode de dénombrement en milieu solide (*tableau 36*).

Date de prélèvement des 60 explantats		Nombre de tubes pollués	Pourcentage
2	XI 62.	5	8,3 %
4	XII	20	33 %
18	XII	27	45 %
4	I 63.	21	35 %
14	I	36	60 %
1	II	9	15 %

Tableau 35. — *Germination retardée chimiquement. Variations du nombre de tubes pollués en fonction des dates de prélèvement.*

Date des prélèvements		Nombre de colonies dans chaque boîte de PÉTRI						Moyenne
30	X 63	5.	8.	17.	4.	0.	2.	6
4	XI	17.	14.	12.	0.	20.	22.	14
12	XI	11.	33.	17.	15.	24.	28.	21
18	XI	80.	31.	71.	69.			63
25	XI	77.	51.	68.	75.	92.	43.	67
2	XII	85.	98.	32.	76.	63.	79.	72
9	XII	84.	68.	92.	72.	80.	95.	81
16	XII	102.	65.	86.	103.	85.	94.	89
30	XII	128.	92.	130.	81.	74.	82.	97
8	I 64	115.	83.	91.	127.	123.	72.	101
15	I	52.	54.	72.	64.	81.	49.	62

Tableau 36. — *Germination retardée chimiquement. Variations du nombre de bactéries hébergées par les tubercules de pomme de terre en fonction des dates de prélèvement.*

L'usage de l'isopropyl-phényl-carbamate modifie donc (*fig. 11*) l'évolution de la population bactérienne au sein des tubercules. Ce produit retarde d'environ quinze jours le déclenchement de l'augmentation importante du nombre de micro-organismes. Il diminue leur vitesse de prolifération. Cependant il ne contrarie que quantitativement l'évolution naturelle de la population bactérienne : elle est toujours caractérisée, même avec cet inhibiteur, par une phase d'augmentation progressive suivie d'une brutale diminution.

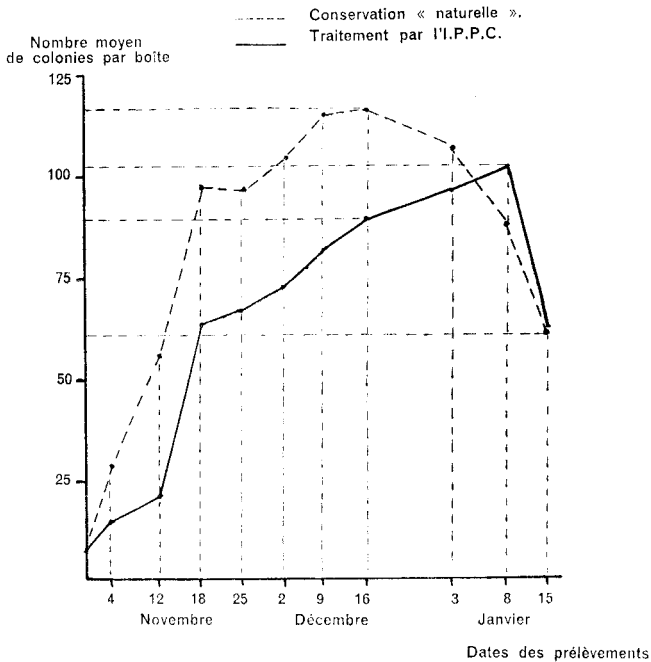


FIG. 11. — Influence de l'iso-propyl-phényl-carbamate (I.P.P.C.) sur les variations de la population bactérienne au sein des tubercules.

VII. — ÉTUDE DE L'ÉVOLUTION BACTÉRIENNE EN RELATION AVEC LA LEVÉE DE DORMANCE

Après qu'en 1900, JOHANNSEN fut parvenu à éveiller les bourgeons dormants du Lilas toute une série de travaux virent le jour. Des procédés et des substances très variés furent proposés pour rompre la dormance : effeuillage (BERTHOLD, 1904), l'eau chaude (MOLISCH, 1909), lumière continue (KLEBS, 1911), injections variées et traumatismes (WEBER, 1911), froid artificiel (COVILLE, 1920), dessiccation (AYMARD, 1904), etc... Mais à partir de 1920 les travaux les plus intéressants sont, sans conteste,

ceux du Boyce Thompson Institute où, sous l'impulsion de DENNY (1926 *a* et *b*, 1932), puis de GUTHRIE (1931, 1938, 1940) et THORNTON (1944), il fut montré que la dormance des tubercules de pomme de terre pouvait être levée par des corps chimiques très particuliers, tels que : la monochlorhydrine du glycol, le glutathion, les thio-cyanates, la thio-urée, etc... Certaines de ces substances sont toujours utilisées, rappelons-le, dans la pratique agricole : la monochlorhydrine du glycol permet, en effet, en supprimant la dormance, d'effectuer dans la même année une seconde récolte qui est très utile pour vérifier l'état sanitaire de la première.

Récemment RAPPAPORT et SMITH (1962), ont établi que la pulvérisation de gibbérelline sur le feuillage permettait également d'obtenir la germination des pommes de terre immédiatement après la récolte et même bien avant puisque ces auteurs ont pu l'observer sur des tubercules encore reliés au tubercule mère.

Par ailleurs, les modifications physiologiques et biochimiques qui se produisent dans les tubercules et les bourgeons que l'on a soumis à la levée artificielle de dormance ont été très étudiées. On a noté, en comparaison avec les plantes non forcées, une augmentation importante des composés azotés solubles, des protéines, des glucides, du phosphore lipidique (QUETEL, 1938).

Le forçage semble augmenter la vitesse et la succession des phénomènes physiologiques sans en changer la nature même.

En ce qui concerne plus particulièrement les tubercules de pomme de terre, on peut considérer, en résumant un certain nombre de travaux de GUTHRIE et DENNY, qu'aussitôt après le traitement qui lève la dormance, se produit une élévation des glucides solubles et surtout un accroissement très rapide de tous les phénomènes respiratoires marqué notamment, outre l'augmentation de la teneur en enzymes respiratoires et en glutathion, par une forte élévation, pendant les trois premiers jours, du CO₂ dégagé. JOLIVET (1959), effectuant des dosages d'acides organiques dans des tubercules dont la dormance a été levée, pense que ce traitement a une action primaire sur la respiration : « Il y aurait un déséquilibre momentané entre les systèmes enzymatiques intervenant dans le cycle de Krebs, certains enzymes se trouvant d'abord plus activés que d'autres » ; ceci pourrait expliquer l'accumulation importante de l'acide succinique qu'il a constaté dans son matériel.

D'autre part, le traitement des tubercules de la variété « Kisvarda rose » par la rindite détermine, selon SZALAI (1959 a), dans la partie apicale de l'organe, une augmentation importante de la teneur en acide indole-acétique pendant les quinze premiers jours qui suivent l'action du produit. Le même auteur s'intéressant (1959 b) dans les mêmes conditions, aux modifications subies par les acides aminés, signale une augmentation du glutathion et surtout un transport du tryptophane depuis la moelle des tubercules jusqu'au cortex où il se comporterait en précurseur des dérivés indoliques qui finalement déclenchent le bourgeonnement.

La levée de dormance est donc on le voit, un phénomène très complexe ; il peut d'ailleurs se réaliser par des voies très variées puisque différents produits tous efficaces à cet égard, n'ont pas du tout les mêmes



répercussions sur le métabolisme : c'est ainsi que la monochlorhydrine du glycol accroît l'activité amylolytique mais les thiocyanates, tout aussi efficaces, n'agissent pas sur elle. De même l'augmentation de la perméabilité cellulaire est sensible à la monochlorhydrine mais insensible à la thiourée.

Malgré tous ces travaux et ces réussites empiriques il faut cependant reconnaître qu'il est encore très difficile d'expliquer le mécanisme de la dormance. Beaucoup d'hypothèses ont été émises.

APPLEMAN (1914) avait remarqué que la conservation au chaud (35° C) pouvait abrégé le temps de latence.

HEMBERG (1949, 1954) attribue l'impossibilité de la germination à la présence d'une substance inhibitrice qui serait surtout localisée dans le périoderme au voisinage des yeux.

BLOMMAERT (1954) a confirmé cette interprétation. Nous avons nous-même, en collaboration (MONTUELLE et CORNETTE, 1964) retrouvé ces inhibiteurs dans les dosages de substances de croissance au sein des tubercules.

THORNTON (1944) considère que l'élimination de la dormance est liée à une certaine anaérobiose : à mesure que le périoderme s'épaissit l'accès de l'oxygène est plus difficile. D'autre part, le séjour pendant dix à vingt jours en atmosphère d'azote élimine la dormance et supprime aussi la dominance du bourgeon apical.

La faiblesse de la teneur en auxine libre au moment de la dormance a été également quelquefois mise en avant : la germination ne se produirait que lorsque le précurseur auxinique aurait migré en quantité suffisante sous le périoderme à proximité des yeux.

Inversement on parvient, et cela offre aussi un intérêt pratique, à prolonger la période de dormance par saupoudrage des tubercules par l'ester méthylique de l'acide naphtyl-acétique ou mieux encore par l'isopropyl-phényl-carbamate.

Considérant nous aussi ce problème de la levée de dormance nous avons entrepris (MONTUELLE, 1961), d'examiner l'évolution de la population bactérienne des tubercules au cours des traitements qui lèvent la dormance. Dans ce but nous nous sommes adressé à deux catégories de produits différents :

- les dérivés de carbure d'hydrogène ;
- des composés organiques sulfurés.

La rindite est un mélange commercial couramment employé dans lequel entrent des substances du premier groupe très voisines des anesthésiques : la monochlorhydrine du glycol (70 %), le dichloréthane (20 %) et le tétrachlorure de carbone (10 %).

Du second groupe, nous avons retenu la thiourée.

1° Action de diverses concentrations de rindite.

Des tubercules fraîchement récoltés sont soumis pendant trois jours, dans des bocaux hermétiquement clos, aux vapeurs de rindite. Dans une série de ces récipients d'un volume de 2 l nous plaçons le même nombre de tubercules (12) et ajoutons respectivement dans chaque bocal : 1, 2, 4 ou 10 ml de rindite de façon à réaliser une atmosphère plus ou moins riche en vapeurs de ce mélange. Evidemment un bocal témoin qui reste clos pendant toute la durée de l'expérience n'a pas reçu de rindite.

A l'issue de la période de trois jours, pour chaque concentration du produit et trois répétitions complètes de l'expérience, nous effectuons les dénombrements de bactéries, selon la méthode des explantats en milieu liquide, en prélevant dans chaque tubercule 6 explantats au centre et 6 en périphérie.

Les résultats sont portés sur le graphique (fig. 12) où sont notés, en abscisse les concentrations de rindite exprimées par litre de volume de récipient et en ordonnée le pourcentage de réponses positives pour le centre et la périphérie.

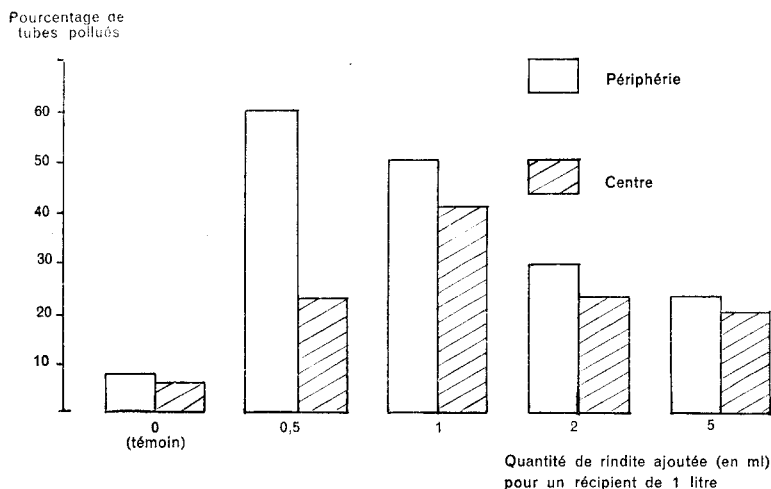


FIG. 12. — Action de diverses concentrations de rindite sur la population bactérienne des tubercules de pomme de terre traités pendant trois jours.

Dans tous les cas, les micro-organismes sont toujours plus abondants dans les organes traités, que dans les témoins. On remarque surtout que pour la concentration de 0,5 ml/1.000 ml l'augmentation de la population bactérienne est très importante dans la région périphérique (de 15 à 60 %). Les concentrations supérieures à 1 sont moins favorables, peut-être en raison des propriétés anesthésiques du mélange. Si les

variations dans la région centrale, reproduisent celles qui se rapportent à la zone périphérique, il existe cependant un certain décalage dans les concentrations optimales qui traduit sans doute la moins grande accessibilité de la région interne aux vapeurs du mélange.

Le traitement par la rindite retient donc incontestablement et très rapidement sur le nombre de micro-organismes hébergés. Il faut souligner que la concentration la plus efficace dans la pratique agricole (0,5 ml/1.000 ml) correspond dans nos travaux à celle qui provoque l'accroissement le plus important de la population bactérienne au sein des tissus.

2^o Action de diverses concentrations de thiourée :

Pour le traitement par la thiourée, on immerge les tubercules pendant deux heures dans une solution aqueuse à 1,2 ou 3 % de ce produit. Trois jours après nous évaluons la population bactérienne au sein des organes cette fois, uniquement dans le cortex.

On retrouve (*fig. 13*), à un degré moindre pourtant, l'augmentation du nombre de bactéries que nous avons obtenue avec la rindite. Il y a ici encore correspondance entre les concentrations usuelles (1 et 2 %) et celles qui conduisent au développement bactérien le plus important.

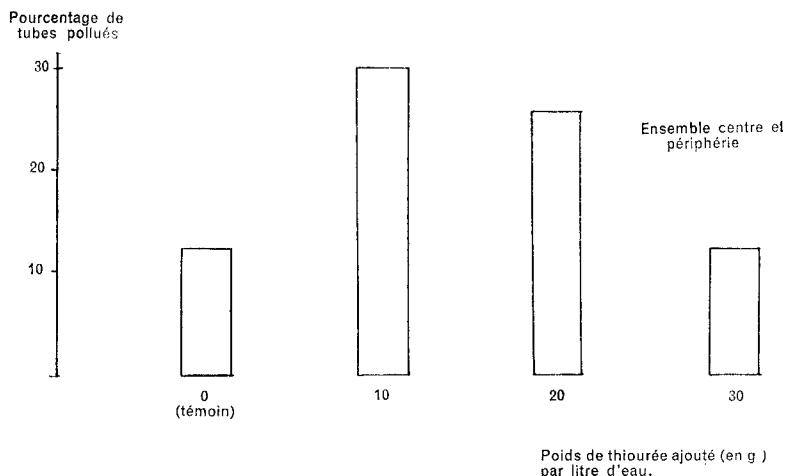


FIG. 13. — Action de diverses concentrations de thiourée sur la population bactérienne des tubercules de pomme de terre.

3^o Influence de la durée et de la date du traitement par la rindite :

Nous avons, dans le cadre de ce nouvel essai, retenu d'une part, la concentration qui s'était montrée la plus intéressante dans l'expérience précédente, c'est-à-dire : 0,5 ml/l et d'autre part, les durées d'exposition aux vapeurs, en récipients clos, de 2, 4, 6, 8 et 10 jours.

Ces différents traitements sont appliqués à un même lot de tubercules nouveaux, premièrement aussitôt après la récolte, dès l'entrée au laboratoire (25-IV) et deuxièmement après y avoir été conservé un mois environ (20-V).

C'est dans la première expérience (*fig. 14*) et pour la durée de quatre jours que la variation du nombre de bactéries est la plus sensible. Dans la seconde expérience, réalisée plus tardivement, la population bactérienne s'accroît encore mais bien plus faiblement. Le décalage entre les deux courbes est très net. A partir du huitième jour d'exposition aux vapeurs, dans les deux expériences, la population bactérienne augmente notablement ; mais nous ne pensons pas qu'il faille attacher de l'importance à ce phénomène : il doit être en relation, comme nous le verrons ultérieurement, avec l'asphyxie des tubercules qui, rappelons-le, séjourne dans des récipients hermétiquement clos.

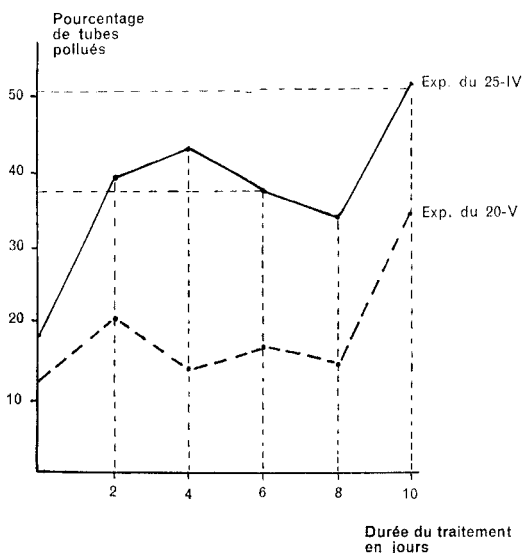


FIG. 14. — Influence de la durée du traitement à la rindite (0,5 ml par litre) sur la population bactérienne des tubercules de pomme de terre.

Nous pouvons donc considérer, à la lumière de ces résultats, que la sensibilité des micro-organismes au mélange activant (ou aux modifications de métabolisme de la pomme de terre induites par lui) varie suivant l'état végétatif des tubercules expérimentés. A cet égard, nous pensons que la première expérience (25-IV) correspond au début de la période de dormance ; la seconde (20-V) pourrait se placer à la fin ou au-delà de cette même période.

Il faut enfin, une fois encore, remarquer que la durée optimale utilisée dans la pratique agricole (trois jours) coïncide avec l'existence d'une population bactérienne maximale au sein des tubercules.

4^o **Population bactérienne au cours de la maturation de tubercules en végétation ou pendant leur conservation au laboratoire :**

Pour réaliser cette expérience nous avons planté des tubercules de la variété Eersterling (hâtive). Dès le début de juin nous avons récolté en une seule fois une quantité importante de tubercules que nous avons conservés au laboratoire pendant un mois et demi. Nous y avons effectué chaque semaine selon les techniques déjà exposées des déterminations de population bactérienne.

Corrélativement, chaque semaine également, et à la même date que ci-dessus, nous avons opéré les mêmes mesures dans des tubercules de même origine mais laissés en végétation et récoltés le jour qui précédait la série d'explantats.

Le tableau 37, donne les pourcentages de pollutions enregistrées :

Dates	1 ^{re} sem. (1)	2 ^{me} sem.	3 ^{me} sem.	4 ^{me} sem.	5 ^{me} sem.	6 ^{me} sem.
<i>Maturation</i>	19 %	23 %	10,5 %	16 %	45 %	31 %
<i>Conservation</i>	19 %	27 %	9,5 %	11 %	23 %	12 %

Tableau 37. — Pourcentages de pollutions enregistrées à partir de tubercules laissés en végétation (maturation) ou conservés au laboratoire (conservation). (1) Début juin.

On constate qu'au cours de la maturation, la population bactérienne s'accroît (moyenne des trois premières semaines 17,5 % ; moyenne des trois dernières semaines 30,6 %). La période correspondant à la cinquième semaine (début juillet) est marquée par un accroissement notable de peuplement (45 %). Ce maximum pourrait correspondre à une phase particulière de la végétation, par exemple la maturité physiologique et il importerait de situer exactement ce phénomène dans l'ensemble du cycle végétatif.

Pendant la conservation, les variations sont beaucoup moins importantes (moyenne des trois premières semaines 18,5 % ; moyenne des trois dernières semaines 15,3 %).

Cependant, il est plus intéressant de comparer l'évolution du lot en *maturation* par rapport à celui qui est resté en *conservation* (fig. 15).

On voit qu'à partir de la troisième semaine la population bactérienne évolue beaucoup plus rapidement (plus de 2 fois) dans les tubercules laissés en végétation que dans ceux qui prématurément récoltés, ont été laissés en conservation.

L'écart augmente d'ailleurs progressivement et très régulièrement (1,1 la troisième semaine et 2,58 la sixième semaine). Ceci permet de penser que les apports nutritifs réalisés en période de végétation (éléments minéraux, substances glucidiques, hormones, etc...) ont une action directe ou indirecte mais en tout cas évidente sur l'évolution du peuplement bactérien au sein des tubercules.

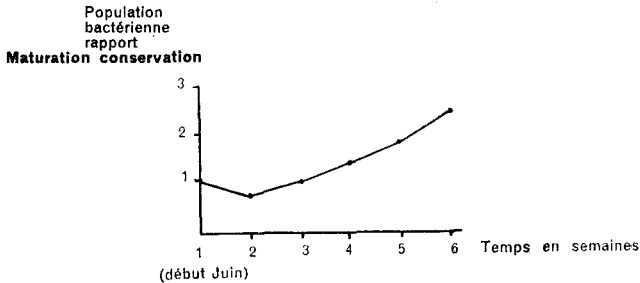


FIG. 15. — Évolution de la population bactérienne dans des tubercules restés en *maturation* par rapport à d'autres laissés en *conservation*.

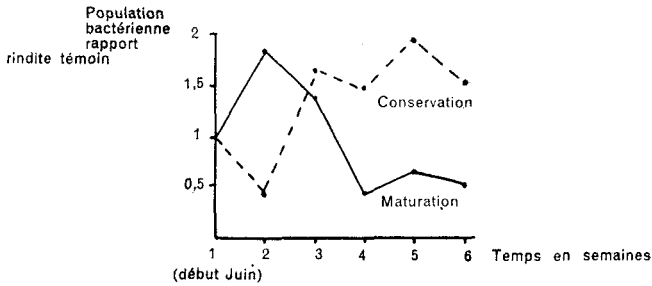


FIG. 16. — Influence de la date de traitement par la rindite sur l'évolution de la population bactérienne dans des tubercules évoluant en *maturation* ou gardés en *conservation*.

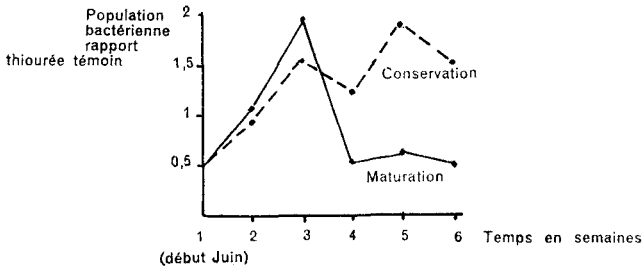


FIG. 17. — Influence de la date de traitement par la thiourée sur l'évolution de la population bactérienne dans les tubercules évoluant en *maturation* ou gardés en *conservation*.

5° **Influence de la date du traitement de levée de dormance :**

Cette expérience a été menée parallèlement à la précédente.

Chaque semaine nous avons soumis à la rindite (1) et à la thiourée (1) : d'une part, des tubercules conservés au laboratoire et, d'autre part, des pommes de terre de même origine mais prélevées en culture, chaque semaine, avant le traitement de levée d'inhibition.

A l'issue de ces traitements nous effectuons les séries d'explantats pour déterminer les pourcentages de pollution.

A) TRAITEMENT PAR LA RINDITE :

A noter en premier lieu (*tableau 38*) que dans chaque cas un chiffre est nettement supérieur à tous les autres : 48 pour la *conservation* et 49 pour la *maturation*. Ces chiffres élevés sont encadrés de deux chiffres nettement plus faibles, ce qui semble indiquer qu'il existe pour les deux lots une période assez courte particulièrement propice à l'action de la rindite sur le peuplement bactérien. Elle se situe d'ailleurs à des époques différentes pour les deux lots : la cinquième semaine en conservation et la deuxième en maturation. En conservation, le caractère de réactivité à la rindite évolue de façon parallèle à celui des tubercules restés en culture mais toutefois beaucoup plus lentement.

Dates	1 ^{re} sem.	2 ^{me} sem.	3 ^{me} sem.	4 ^{me} sem.	5 ^{me} sem.	6 ^{me} sem.
<i>Maturation</i>	22 %	49 %	14 %	9 %	28 %	14 %
<i>Conservation</i>	22 %	12 %	20 %	20 %	48 %	19 %

Tableau 38. — Pourcentages de pollutions enregistrées à partir de tubercules traités par la rindite à différentes dates et différents états de végétation.

Si nous comparons maintenant les chiffres du tableau ci-dessus non plus entre eux mais par rapport aux chiffres obtenus pour les témoins correspondants non traités (*tableau 37*, p. 104), nous pouvons tracer les courbes de la *fig. 16*, p. 105. Il existe en maturation une période allant de la première à la troisième semaine pendant laquelle la rindite augmente le peuplement (par rapport au témoin non traité) et une autre période de la quatrième à la sixième semaine au cours de laquelle le mélange activant produit une diminution de ce peuplement.

En conservation la phase d'augmentation se produit plus tard mais elle dure plus longtemps (de la troisième à la sixième semaine).

Ces résultats mettent nettement en évidence l'existence d'une inversion dans l'action de la rindite sur le peuplement bactérien.

(1) Dans les conditions définies ci-dessus, p. 101 et 102.

B) TRAITEMENT PAR LA THIOURÉE.

Avec la thiourée, sur les mêmes lots et dans les conditions indiquées ci-dessus, les résultats (*tableau 39,*) sont moins nets que pour la rindite.

Dates	1 ^{re} sem.	2 ^{me} sem.	3 ^{me} sem.	4 ^{me} sem.	5 ^{me} sem.	6 ^{me} sem.
<i>Maturation</i>	7 %	27 %	25 %	12 %	23 %	15 %
<i>Conservation</i>	7 %	30 %	19 %	10 %	50 %	15 %

Tableau 39. — *Pourcentages de pollutions enregistrées à partir de tubercules traités par la thiourée à différentes dates et différents états de végétation.*

On retrouve cependant pour chaque lot un maximum situé aux mêmes époques que pour la rindite, c'est-à-dire la cinquième semaine (50 %) pour la conservation et la deuxième semaine (27 %) pour la maturation.

La comparaison de ces résultats avec les chiffres obtenus pour les tubercules témoins non traités pendant la même période permet de tirer les mêmes conclusions que pour la rindite. En maturation, de part et d'autre (*fig. 17, p. 105*) d'un effet nettement positif sur le peuplement bactérien on trouve deux périodes pendant lesquelles la thiourée a sur celui-ci un effet nul ou inhibiteur.

En conservation l'effet inhibiteur est beaucoup plus court (première semaine) et pendant cinq semaines consécutives la thiourée augmente la population bactérienne au sein des tubercules.

En conclusion de cet ensemble d'expériences sur la période de dormance et la levée d'inhibition nous pensons qu'au cours du métabolisme normal des tubercules en végétation il existe un moment précis et court pendant lequel la population bactérienne s'accroît dans les tubercules : cette augmentation ne se produit pas dans des tubercules récoltés prématurément.

Deux des produits utilisés pour lever la dormance : la rindite et la thiourée, employés dans des conditions de concentration et de durée habituellement efficaces, provoquent une augmentation importante du nombre de bactéries au sein des organes. Cependant, la sensibilité des micro-organismes aux produits activants varie selon l'état végétatif des tubercules soumis aux traitements.

VIII. — INFLUENCE DE FACTEURS EXTERNES DIVERS SUR LA POPULATION BACTÉRIENNE DES TUBERCULES

Ce court chapitre est consacré à l'étude des modifications qui surviennent dans la population bactérienne des tubercules placés dans des conditions externes très diverses : élévation de température, séjour

sous vide ou dans l'oxygène, immersion dans un liquide. Ces expériences ont pour but d'établir si, à l'intérieur des cellules, les micro-organismes sont capables de réagir aux facteurs externes.

1° Élévation de la température :

Un lot de tubercules de même origine est divisé en deux parties. La première est entreposée dans un local où la température est restée voisine de 10° C. La seconde est placée à l'étude à 30° C. Des séries de 72 explantats sont effectuées dans l'un et l'autre cas au bout de 8, 12 et 18 jours.

L'élévation de température aboutit à l'augmentation du nombre de micro-organismes hébergés (*tableau 40*). Un nouvel équilibre semble s'établir ; il est atteint à 30° C dès le douzième jour.

Temps écoulé	Séjour à 10° C	Séjour à 30° C
0 jour	8,3 %	8,3 %
8 jours	6,9 %	16,6 %
12 —	8,3 %	27,7 %
18 —	9,6 %	27,7 %

Tableau 40. — Influence de la température sur le pourcentage de tubes pollués obtenus par la méthode des explantats en milieu liquide.

2° Séjour sous pression réduite :

Le séjour des tubercules dans l'air à pression réduite a lieu dans de grands dessiccateurs où la pression est journellement contrôlée. Outre une expérience témoin dans les mêmes conditions mais à la pression atmosphérique en air confiné nous avons réalisé, dans les récipients, des pressions de 46, 26 et 6 cm de mercure. Les dénombrements sont effectués par la méthode des numérations en milieu solide quinze et trente jours après le début de l'expérience.

Pression	15 jours	Moyenne	30 jours	Moyenne
Atmosphérique .	53. 16. 25. 27. 20. 32.	28	47. 34. 18. 35. 61. 20.	35
46 cm. de Hg .	21. 67. 11. 8. 23. 18.	24	75. 87. 63. 64. 32. 46.	61
26 cm. de Hg .	25. 7. 14. 12. 6. 5.	11	72. 28. 60. 39. 45. 43.	47
6 cm. de Hg .	36. 77. 84. 42. 57. 61.	59	212. 184. 264. 156. 256.	192

Tableau 41. — Dénombrements bactériens après séjour des tubercules sous pressions réduites.

Les résultats (*tableau 41*) sont assez désordonnés : mais néanmoins les micro-organismes ont très abondamment ($\times 5$) proliféré lorsque les tubercules ont séjourné trente jours à la pression la plus faible (6 cm de mercure).

Nous pensons que la raréfaction de l'air et le trouble des phénomènes respiratoires qui en résulte peuvent avoir des répercussions soit sur la destruction des mécanismes naturels qui s'opposent dans les conditions normales à la prolifération des bactéries, soit sur la dégradation des glucides complexes en sucres assimilables par les micro-organismes.

3° Séjour dans l'oxygène.

Les tubercules placés dans un dessiccateur sont soumis à un courant lent mais continu d'oxygène. Les dénombrements de bactéries sont effectués (en milieu solide) après dix-sept et vingt-quatre jours de ce traitement. Les résultats peuvent être comparés (*tableau 42*) à ceux des témoins qui sont restés en atmosphère normale.

	17 jours	Moyenne	24 jours	Moyenne
Témoin	112.114. 57. 96.104.107.	98	129. 83.130.142.135. 51.	111
Oxygène	10. 25. 14. 17. 9. 11.	14	7. 11. 5. 13. 20. 2	9

Tableau 42. — *Dénombrements bactériens après séjour des tubercules dans un courant d'oxygène.*

L'oxygène, on le voit, se comporte comme un inhibiteur puissant des bactéries au sein des cellules. Il faut également souligner qu'il a totalement empêché l'apparition des bourgeons sur les tubercules.

4° Immersion des tubercules.

A) DANS UN MILIEU NUTRITIF.

Chaque tubercule, stérilisé au sublimé et flambé, est introduit dans un Erlenmeyer à large col renfermant une hauteur suffisante d'un bouillon nutritif (A 5). On conserve les flacons pendant huit jours à la température du laboratoire en éliminant évidemment les récipients pour lesquels le trouble du milieu, révélateur d'un développement bactérien, prouve la non-efficacité de la stérilisation de surface des tubercules.

On réalise alors, à partir de 6 tubercules provenant de 6 récipients restés stériles, une série de 72 explantats dont on compare les résultats avec une série correspondante effectuée sur des tubercules non immergés.

Les résultats de deux expériences différentes sont données au *tableau 43*.

	Pourcentage de tubes troublés	
	1 ^{re} expérience	2 ^{me} expérience
Témoin le jour de l'immersion	8,33 %	9,72 %
Témoin à la fin de l'immersion	9,72 %	13,88 %
Après 8 jours d'immersion	38,88 %	30,55 %

Tableau 43. — *Variations du pourcentage de tubes troublés à partir d'explantats provenant de tubercules immergés ou non dans un milieu nutritif.*

Il y a, on le voit, au cours de l'immersion, une augmentation appréciable du nombre de micro-organismes. Cependant, la pénétration du bouillon de culture à l'intérieur des organes pouvait permettre, au premier abord, d'expliquer la prolifération des bactéries. Aussi avons-nous repris la même expérience d'immersion mais en utilisant cette fois un liquide non nutritif et antiseptique.

B) DANS UNE SOLUTION DE SUBLIMÉ.

Les tubercules lavés sont plongés dans un bocal renfermant une quantité suffisante de solution de sublimé à 0,2 %. Nous avons ici encore étudié l'évolution de la population bactérienne par les deux méthodes.

— *Méthode des explantats en milieu liquide :*

Des séries d'explantats sont effectuées au bout de quatre et huit jours d'immersion. On réalise pour les comparaisons des séries identiques dans un lot témoin de même origine mais non immergé.

On observe encore (*tableau 44*) une forte prolifération bactérienne.

	Pourcentage de tubes pollués
Jour de l'immersion	13,8 %
4 jours après l'immersion	19,4 %
8 jours après l'immersion	88,3 %
Témoin à la fin de l'immersion	12,5 %

Tableau 44. — *Variations du pourcentage de tubes pollués à partir d'explantats provenant de tubercules immergés ou non dans une solution de sublimé.*

— *Méthode de dénombrement en milieu solide :*

Nous retrouvons (tableau 45) avec plus de précision le même phénomène que ci-dessus :

Durée	Dénombrements bactériens						Nombre de colonies par boîte								
	Témoins						Moyenne	Immersion						Moyenne	
0 jour	5.	8.	17.	4.	0.	3.	6								
4 jours	18.	7.	9.	23.	21.	16.	15	31.	48.	51.	79.	57.	54.		53
6 -	34.	21.	38.	27.	19.	23.	27	56.	74.	63.	80.	85.	79.		72
9 -	73.	36.	29.	55.	81.	49.	53	208.	196.	248.	276.	236.	280.		240
11 -	58.	34.	95.	72.	60.	69.	64	33.	15.	19.	25.	21.	11.		20
12 -	83.	87.	41.	38.	91.	63.	67	6.	10.	11.	8.	0.	9.		7

Tableau 45. — *Dénombrements bactériens dans des tubercules immergés ou non dans une solution de sublimé.*

Il y a donc, au cours des neuf premiers jours de l'immersion dans la solution de sublimé, une très forte prolifération bactérienne. Ce résultat assez paradoxal s'explique, pensons-nous, par l'intervention de deux facteurs.

L'immersion dans un liquide provoque l'asphyxie de l'organe ; celui-ci se défend en dégradant les polysaccharides, abondants dans la pomme de terre, en sucres simples dont les micro-organismes s'alimentent : c'est un facteur de prolifération.

Mais, simultanément le sublimé pénètre lentement dans les tissus de l'organe en détruisant les micro-organismes : c'est un facteur bactéricide.

Il y a compétition entre ces deux phénomènes. A partir du neuvième jour le second facteur l'emporte sur le premier et la population bactérienne commence alors à diminuer rapidement.

IX. — CONCLUSIONS

Les travaux que nous venons de rapporter établissent donc d'une façon très nette que les micro-organismes présents dans les tubercules de pomme de terre sont sensibles aux variations des conditions extérieures dans lesquelles ces organes sont entreposés.

L'élévation de température, la raréfaction de l'air, l'immersion dans un liquide sont des facteurs qui favorisent la prolifération bactérienne. Au contraire le séjour dans l'oxygène est, à cet égard, un facteur nettement antagoniste.

Il faut donc considérer, en généralisant, que les conditions extérieures de séjour des tubercules retentissent de façon très nette sur l'évolution de la population bactérienne dans ces organes.

Il est un autre point sur lequel nous désirons spécialement attirer l'attention : ces expériences détruisent de façon nette et définitive l'objection qui nous a été parfois faite selon laquelle les bactéries que nous isolons seraient soit des micro-organismes existant à la surface des organes, soit même de simples accidents, pollutions de laboratoire. Cette façon de voir n'a, dans le cadre de notre travail, aucune valeur.

Le fait d'enregistrer, les conditions de manipulation restant constantes, des variations aussi importantes ($\times 6$) aussi régulières, aussi logiquement attendues (élévation de température), que celles dont nous avons rendu compte prouve bien que nous étudions un phénomène se produisant au sein des organes examinés. Nous pensons, à cet égard, que l'immersion dans le sublimé apporte, s'il en était besoin, toute garantie à nos travaux.

CHAPITRE V

Synthèse de substances de croissance par les bactéries isolées des végétaux sains

La place qu'occupe aujourd'hui en physiologie végétale le chapitre des substances de croissance est de tout premier ordre. Il n'est ni dans notre compétence ni dans notre propos de nous étendre dans le cadre de ce travail sur ce sujet qui a fait l'objet d'un nombre considérable de travaux (1).

En dépouillant ce vaste ensemble on constate cependant que la production, *in vitro*, par les bactéries, de substances de croissance actives sur les végétaux supérieurs n'a été qu'assez rarement abordée. Sans doute faut-il en voir la raison dans le fait que cette étude se place à la limite entre deux spécialités différentes : la physiologie végétale et la bactériologie. Il n'entre généralement pas dans les préoccupations du physiologiste de s'intéresser aux bactéries et de même le bactériologiste se soucie ordinairement assez peu de savoir s'il existe dans les milieux de culture bactériens des substances de type hormonal agissant sur le métabolisme des végétaux.

Pour les auxines les travaux sont restés presque exclusivement, jusqu'à ces dernières années, centrés sur les *Rhizobium* et les bactéries du crown-gall. Signalons parmi beaucoup d'autres sur ces sujets les résultats de LINK (1937), CHEN (1938) et THIMANN (1959) pour le premier, et BERTHELOT et AMOUREUX (1938) pour le second. Plus récemment PATE (1958), KEFFORD, BROKWEIL et ZWAR (1960), BULARD, GUICHARDON et RIGAUD (1963) aboutissent à la caractérisation nette de l'acide indole-acétique et de l'indole-acéto-nitrile dans les substances indoliques issues du métabolisme du tryptophane dans les cultures de *Rhizobium*.

(1) Le lecteur intéressé pourra par exemple consulter le vol. XIV de l' « Encyclopedia of plant physiology » dirigée par RUHLAND (1961).

En dehors de ces deux sujets bien précis, pour les autres micro-organismes, notamment pour ceux que l'on rencontre dans le sol, FALLOT (1964), vient de publier dans sa thèse une revue bibliographie très complète (tableau 46, p. 115). Nous ajouterons simplement que RIVIÈRE (1963) a mis lui aussi en évidence l'existence de substances auxiniques dans les cultures de bactéries de la rhizosphère du blé (*Pseudomonas fluorescens*, *Achromobacter* sp., *Flavobacterium diffusum* et *invisibile* *Sarcina flava*, *Bacillus cereus*, *B. megaterium*, *B. brevis*, *B. circulans*, notamment).

En ce qui concerne, d'autre part, la synthèse, *in vitro*, de substances du groupe des gibbérélines par les bactéries les relations de travaux sont très peu nombreuses.

— VANCURA (1961) a décelé dans les filtrats de culture d'*Azotobacter chroococcum* non seulement de l'acide indole-acétique mais aussi de l'acide gibbéréllique.

— KATZNELSON et coll. (1962) ont fait de même pour *Arthrobacter globiformis*.

— RIVIÈRE (1963), d'une part, et PANOSSIAN et collab. (1963) ont provoqué l'élongation de plantules de pois nains en pulvérisant directement sur leur feuillage des filtrats de culture de bactéries de la rhizosphère.

— Nous-même enfin, en collaboration avec CHEMINAIS (1964), séparant les produits par chromatographie et utilisant un test de dosage spécifique (élongation de la feuille d'*Avena*), avons pu caractériser nettement l'existence de substances du groupe des gibbérélines dans les milieux de culture où nous avons semencé des bactéries associées aux tissus végétaux apparemment sains.

Bien entendu, à côté des composés indoliques et des gibbérélines il existe encore dans les milieux de culture beaucoup d'autres substances susceptibles d'agir sur le métabolisme des plantes : les acides aminés, les antibiotiques, les vitamines. Nous n'avons pu, sur le plan expérimental, nous intéresser à ces substances. Analyser l'abondante littérature scientifique qui leur est consacrée serait hors de notre sujet (1).

Reconnaître *in vitro* la présence de toutes ces substances dans les produits du métabolisme bactérien est un premier pas. Il doit se poursuivre, du moins en ce qui nous concerne, par l'étude de l'action directe *in vivo* des bactéries dans les cellules végétales.

Une première façon de considérer ce problème consiste à examiner, sous l'angle des substances de croissance, les relations naturelles qui s'établissent entre les bactéries et les plantes supérieures : nodosités, crown-gall, rhizosphère.

THIMANN avait déjà en 1936 signalé que les nodosités sont riches en auxine et fait de l'acide-indole-acétique le principal responsable de la stimulation tissulaire lors de la formation de ces organes.

(1) On trouvera quelques indications essentielles dans la thèse de FALLOT (1964).

Microorganismes	« Test biologique »	Auxine	Auteurs
MILIEU SANS TRYPTOPHANE			
<i>Azotobacter chroococcum</i>	Courbure coléopt.	?	RAZNIZINA 1938
id.	Embryon de plantes	AIA surt	KRONBERGER 1949
id.	Racines excisées	?	KANDLER 1951
id.	Racines excisées	Auxine + ?	BUKATSCH et coll. 1952
id.	id.	AIA	BUKATSCH et coll. 1956
id.	Section coléopt.	AIA	SMALIJ et coll. 1957
id.	Racines excisées	AIA + ?	BURGER et coll. 1958
id.	Plantules <i>Hordeum</i>	AIA + AIC	VANGURA et coll. 1960
<i>A. vinelandii</i>	Racines excisées	AIA	BUKATSCH et coll. 1956, BURGER et coll. 1958
<i>A. agile</i>	Section coléopt.	AIA	SMALIJ et coll. 1957
19 esp. bact. de sols	Courbure coléopt.	AIA	ROBERTS et coll. 1939
<i>E. coli</i> , <i>Aerobacter aerogenes</i>	Courbure coléopt.	?	BURKHOLDER 1939
<i>B. subtilis</i> , <i>B. mycoïdes</i>	Racines excisées	?	KANDLER 1951
Des <i>Pseudomonas</i> , des <i>Bacillus</i>	Section coléopt.	AIA	SMALIJ 1958
Des bact. rhizosphère, <i>B.</i> <i>megaterium</i> var. <i>phos-</i> <i>phaticum</i>	Section coléopt.	AIA	BERSHOVA 1959
Des <i>Arthrobacter</i>	Section coléopt.	AIA	KATZNELSON et coll. 1961
Des <i>Bacillus</i> , des <i>Actino-</i> <i>mycètes</i>	Germination de pois nains	AIA	PANOSSIAN et coll. 1963
MILIEU AVEC TRYPTOPHANE AJOUTÉ			
<i>E. coli</i> , <i>Ps. fluorescens</i>	—	AIA+AIPy	STOWE 1955
Des <i>Pseudomonas</i> , des <i>Bacillus</i>	Section coléopt.	AIA	SMALIJ 1958
<i>Pseudomonas savastanoi</i>	—	AIA	BELTRA 1959
<i>Flavobacterium</i> sp., <i>Kleb-</i> <i>siella aerogenes</i> , <i>B. me-</i> <i>gaterium</i> ...	—	AIA	MONTUELLE 1963
MILIEU DONT CERTAINS CONSTITUANTS RENFERMENT DU TRYPTOPHANE			
<i>B. mycoïdes</i> , <i>B. subtilis</i> ,			
<i>B. radiobacter</i> Prot. vulg.	Courbure coléopt.	?	BOYSEN-JENSEN 1931
<i>Ps. fluorescens</i> , <i>Sarc. lu-</i> <i>tea</i> , <i>B. subtilis</i>	Courbure coléopt.	?	RAZNIZINA 1938
<i>B. radiobacter</i>	Courbure coléopt.	?	LOCKE et coll. 1939
51 esp. bact. de sols	Courbure coléopt.	AIA	ROBERTS et coll. 1939.
<i>B. Solanacearum</i>	Courbure coléopt.	?	GRIEVE 1939

Tableau 46. — (d'après FALLOT). Synthèse d'auxines par des bactéries (AIA : β -indolyl-acétique. AIPy : acide β -indolyl-pyruvique. AIC : acide indolyl-3-carbonique).

Dans les tissus de tumeurs induites par le crown-gall un certain nombre d'auteurs observèrent une très nette hyperauxinie : LINK et EGGERS (1941), KULESCHA et GAUTHERET (1948), HENDERSON (1954) et BITANCOURT (1955).

L'étude de la rhizosphère et de la spermosphère permet, elle aussi, de préciser *in vivo* les rapports entre les bactéries et les plantes supérieures ; quelques travaux s'orientent dans cette voie mais les phénomènes sont évidemment très complexes. KRASSILNIKOV (1962) passe en revue ces problèmes ; il conclut que les micro-organismes du sol synthétisent des composés qui sont essentiels pour la vie de la plante (vitamines, auxines, gibbérellines, facteurs X, Z, P, antibiotiques, amino acides). Il pense que les bactéries sont capables de réaliser dans le sol les mêmes synthèses qu'en milieu nutritif artificiel.

Mettre expérimentalement, artificiellement, en présence l'un de l'autre les bactéries et les plantes est une seconde façon d'étudier leurs relations. On peut faire agir les micro-organismes soit sur des plantes entières, soit sur des fragments excisés (généralement des racines), soit enfin, pour diminuer le nombre de facteurs mis en jeu sur des cultures de tissus.

Pour les plantes entières citons les travaux de STEINBERG (1947) (bactéries du sol : *Erwinia carotovorum*, *Bacillus cereus*, *B. pumilus* agissant sur le *Nicotiana Tabacum*), de POCHON et DE BARJAC (1958) (*Azotobacter chroococcum* en présence de *Zea Mays*), CHALVIGNAC (1962) (Action d'*Azotobacter chroococcum* sur le *Linum usitatissimum*).

Pour les fragments de racines excisées signalons les publications de KANDLER (1951) (*Bacillus mycoides*, *B. subtilis*, *Azotobacter chroococcum* et racines de *Zea Mays*, *Phaseolus*, *Pisum*) et de STOLP (1952) (*B. mycoides* et *Achromobacter* sur les racines de *Zea* et *Pisum*) (1).

Les résultats sont très variables, ils dépendent des espèces bactériennes (quelquefois même des souches) et aussi des végétaux : il y a tantôt inhibition, tantôt stimulation de la croissance, les réactions de tige peuvent être différentes de celles des racines.

En ce qui concerne la culture de tissus, les inoculations ont été réalisées essentiellement avec *Agrobacterium tumefaciens* (GIOELLI, 1940 ; KULESCHA, 1951 ; BRAUN, 1956 ; GAUTHERET, 1959). VOLCANI, RIKER et HILDEBRANDT (1953) ont noté l'inhibition de la croissance de leurs cultures et dans certains cas leur dissociation après inoculation de *Erwinia carotovorum*, *Bacillus subtilis* et *B. polymyxa*. Enfin, les travaux de FALLOT (1964) établissent que diverses bactéries, mais singulièrement *Bacillus megaterium*, sont capables d'induire, par leurs sécrétions, la prolifération du tissu cambial de *Vitis* et du parenchyme du tubercule de topinambour.

En résumé, en ce domaine du rôle des substances de croissance dans les relations entre les bactéries et les plantes supérieures, un certain nombre de faits sont nets mais leur interprétation est particulièrement

(1) On trouvera aussi dans la thèse de FALLOT (1964) d'autres références en particulier sur des travaux en langue russe.

délicate. La variabilité des résultats est très grande et empêche pour le moment toute synthèse. Nous n'avons pu qu'indiquer les orientations différentes des recherches et juxtaposer un certain nombre de publications. Mais allons plus loin ; si l'on tient compte que la plupart des substances de croissance agissent très différemment non seulement selon leur propre concentration mais aussi selon leur concentration relative par rapport à un autre composé, on comprendra à la fois l'extrême complexité des mécanismes mis en jeu et la nécessité de compléter les connaissances en ce domaine.

Cette brève mise au point, très partielle nous semblait nécessaire avant d'aborder l'exposé de nos travaux sur ce sujet. Ils sont consacrés à l'étude des possibilités de synthèse des micro-organismes précédemment isolés et se limitent à la recherche *in vitro* et *in vivo*, de l'acide indole-acétique et des gibbérélines.

I. — ÉTUDE DES SYNTHÈSES IN VITRO

1° Production d'auxine.

A) MATÉRIEL : toutes les souches bactériennes résultant des isollements et déterminations dont nous avons rendu compte au chapitre II, sont conservées au laboratoire et régulièrement entretenues. Pour étudier leur capacité de synthétiser de l'auxine, chacune de ces souches est ensemencée dans un milieu identique à celui qu'ont employé BERTHELOT et AMOUREUX (1938) pour la recherche de l'auxine dans l'action de *Bacterium tumefaciens* sur le tryptophane. Le tryptophane et le pyruvate entrent dans la composition de ce bouillon nutritif dont la formule précise est donnée par ailleurs (A. 31).

Les fioles d'Erlenmeyer contenant 150 ml de milieu séjournent après ensemencement, à l'étuve bactériologique réglée à 30° C.

B) RECHERCHE DE L'AUXINE : deux méthodes différentes furent retenues pour la recherche de l'acide indole-acétique dans les milieux de culture : une technique colorimétrique et la séparation par électrophorèse.

a) Méthode colorimétrique de PILET (1957) :

elle repose sur la réaction de coloration de Salkowski. Le réactif comprend

- 3 ml de Fe Cl_3 , 6 H_2O (1,5 M) ;
- 60 ml de H_2SO_4 (P.S. 1,83) ;
- 100 ml d'eau distillée et déionisée.

Pour le préparer on ajoute au 3 ml de Fe Cl_3 , 50 ml d'eau distillée puis, après dissolution on ajoute l' H_2SO_4 en agitant constamment. On laisse refroidir et on complète avec 50 ml d'eau distillée. On conserve ce réactif au réfrigérateur dans un flacon brun.

On verse 8 ml du réactif précédent dans des tubes à essais que l'on porte à l'étuve à 40° C. Lorsque le réactif est à la température de l'étuve, on ajoute dans chaque tube :

- 1 ml de milieu de culture à analyser filtré sur papier puis sur bougie (pour éviter le trouble bactérien qui gênerait la colorimétrie)
- 1 ml d'alcool éthylique pour augmenter la sensibilité du test.

On agite et on conserve de nouveau les tubes 20 mn à 40° C et à l'obscurité.

On passe les tubes au colorimètre à la longueur d'onde de 530 microns après avoir réglé l'aiguille sur le repère 100 de l'échelle de transmission en utilisant un tube témoin dans lequel outre le réactif on a introduit 1 ml de milieu de culture non ensemencé.

Une minute avant le temps convenable on transfère les mélanges dans les tubes colorimétriques et on exprime les lectures, par rapport au tube témoin, en pourcentage de transmission.

b) Séparation par électrophorèse :

Nous avons utilisé la méthode de FISCHER (1954).

Les milieux de culture à étudier sont centrifugés 15 mn à 5.000 t/mn. Le liquide surnageant est concentré sous vide à basse température (35° C) jusqu'à volume final de 2 à 3 ml. On prélève une goutte de ce mélange à séparer et on la dépose au centre d'une feuille de papier Watman n° 1 (30 × 4 cm) qui est rapidement séchée dans un courant d'air chaud. Les compartiments anodique et cathodique de la cuve à électrophorèse sont remplis par une solution tampon au phosphate (Tampon de Sørensen pH = 7). La tension appliquée aux électrodes est de 110 v. La séparation dure 8 à 12 h.

On laisse ensuite sécher le papier et on met en évidence les substances auxiniques en pulvérisant différents révélateurs.

- 1 - Réactif de Salkowski modifié par GORDON et WEBER (1951)
Fe Cl₃, 6H₂O (0,5 M) 2 ml
H ClO₄ (35 %) 100 ml

- 2 - Réactif de Salkowski modifié par PILET.

La composition en a été donnée ci-dessus dans l'exposé de la méthode colorimétrique.

- 3 - Réactif nitroso-indolique de LINSER et KIERMAYER (1957)
K NO₂ 1 g
H NO₃ (concentré) 20 ml
Ethanol 80 ml

Les colorations obtenues avec ces réactifs sont indiquées au *tableau 47*.

Naturellement il faut localiser exactement l'acide indole-acétique sur les électrophorégrammes. Pour cela avec chaque série d'analyses nous plaçons une bande témoin sur laquelle on a déposé une goutte d'un milieu de culture concentré, non ensemencé et additionné d'acide indole-acétique.

Composés	Réactifs		
	1	2	3
Acide indol-acétique . . .	lie de vin	rose-violet	rouge
Tryptophane	jaune	jaune-brun	jaune

Tableau 47. — Colorations communiquées par différents réactifs à l'acide indole-acétique et au tryptophane.

C) RÉSULTATS : les résultats sont donnés au tableau 48, pour chacune des deux méthodes.

Noms des souches	Méthode colorimétrique % de transmission au bout de : x jours de culture					Electrophorèse après 30 jours de culture
	10 j.	20 j.	30 j.	40 j.	50 j.	
<i>Bacillus subtilis</i> . . .	96	80	64	50	44	++
<i>B. licheniformis</i> . . .	88	76	60	44	40	+++
<i>B. pumilus</i>	84	76	72	70	68	+
<i>B. cereus</i>	88	68	62	58	54	++
<i>B. megaterium</i>	100	40	32	30	24	+++
<i>B. coagulans</i>	100	96	90	80	76	traces
L. 5	98	94	88	84	80	0
L. 9	100	84	78	70	64	+
B. E.	100	94	90	84	80	0
B. F.	96	78	70	70	68	+
B. J.	100	98	90	84	80	0
<i>B. polymyxa</i>	98	76	68	68	66	+
<i>B. sphaericus</i>	100	96	76	56	40	++
L. 11	96	72	70	60	50	++
L. 19	100	84	68	62	56	++
L. 20	96	80	70	64	58	++
L. 22	100	80	64	52	50	++
<i>Pseudomonas</i>						
non pigm. 1	100	80	64	60	56	+++
P. non pigm. 2	70	40	36	32	28	+++
P. pigmenté	50	50	96	90	80	0

Tableau 48. — Production d'acide indole-acétique par les bactéries isolées d'organes végétaux (+ production faible, ++ moyenne, +++ forte).

En colorimétrie nous indiquons pour chaque souche après différents temps de culture les pourcentages de transmission de la lumière.

Pour l'électrophorèse nous donnons des indications relatives (de 0 à + + +) suivant l'intensité de la coloration obtenue et l'étendue de la tache.

On constate d'abord que la correspondance entre les deux méthodes est, d'une façon générale, bonne. Toutefois pour *Bacillus sphaericus* et *Pseudomonas* non pigmenté l'estimation par électrophorèse semble dépasser les valeurs indiquées par la colorimétrie.

Parmi toutes les souches étudiées 5 seulement ne produisent pas d'acide indole-acétique. 15 peuvent synthétiser l'auxine et parmi elles 4 le font avec une intensité notable : *Bacillus licheniformis*, *B. megaterium* et deux espèces de *Pseudomonas* non pigmenté.

Au point de vue des concentrations en acide indole-acétique dans les milieux de culture, il ressort de la courbe de références, préalablement établie pour des dilutions connues, qu'un pourcentage de transmission de

50	correspond à une concentration de	10^{-5}
30	—	10^{-4}

Le *Bacillus megaterium*, la plus productrice de toutes les souches étudiées, peut synthétiser l'acide indole-acétique jusqu'à ce que la concentration dans le milieu atteigne environ 10^{-3} .

Le tableau de chiffres obtenus en colorimétrie tend à montrer, d'autre part, que la production d'acide indole-acétique est assez tardive et peut se prolonger au-delà même du quarantième jour de culture. Dans les conditions de nos expériences il ne semble donc pas survenir de dégradation auxinique (à l'exception toutefois du *Pseudomonas* pigmenté). Ces résultats ne concordent pas avec ceux que RIVIÈRE (1963) a obtenus en partant il est vrai d'un milieu assez différent du nôtre.

Enfin, les électrophorégrammes révèlent, entre la ligne de départ et l'emplacement de l'acide indole-acétique, la présence de différentes taches qui pourraient correspondre à des précurseurs de l'auxine (indolyl acétaldéhyde, indolyl acéto-nitrile et acide indolyl-pyruvique).

En conclusion, la plupart des bactéries isolées des végétaux sont capables de synthétiser l'acide indole acétique *in vitro* dans un milieu contenant notamment du tryptophane et du pyruvate.

2° Production de gibbérellines.

Les connaissances sur les voies de synthèse des gibbérellines sont jusqu'ici assez réduites, nous n'avions par conséquent pas d'indication précise sur la nature des substances qu'il était intéressant d'introduire dans le milieu de culture. Aussi avons-nous eu simplement recours au même bouillon de culture (A. 31) que celui utilisé ci-dessus pour mettre en évidence la synthèse de l'auxine. Les bactériesensemencées appartiennent à la collection du laboratoire : elles ont toutes été isolées de tissus végétaux sains (tableau 49).

Les milieuxensemencés séjournent 45 j à l'étuve réglée à 30° C ; ils sont alors soumis aux techniques d'extraction des gibbérellines.

Noms	Végétal d'origine
<i>Pseudomonas pigmenté</i>	} Chou-navet
<i>P. non pigmenté</i>	
<i>Flavobacterium sp.</i>	Chicorée
<i>Bacillus licheniformis</i>	} Pomme de terre
<i>Bacillus pumilus</i>	
<i>Bacillus cereus</i>	
<i>Bacillus megaterium</i>	Carotte

Tableau 49. — *Origine des espèces étudiées au point de vue de la synthèse des gibbérellines.*

A) ISOLEMENT.

Nous avons adopté la méthode préconisée par WEST et PHYNNY (1959).

a) *Adsorption-élution* : cette phase du travail repose essentiellement d'une part, sur l'adsorption par le mélange charbon activé en poudre et cellite (Hyflosuper cell) et, d'autre part, sur l'élution de ce mélange adsorbant par l'acétone et l'eau.

Les bouillons de culture, centrifugés et filtrés, sont soumis à divers traitements qui, pour simplifier, sont schématisés à la *fig. 18, p. 122*. On voit que les filtrats sont passés à deux reprises sur le mélange charbon-cellite. L'adsorbant est ensuite élué par l'eau d'abord (filtrats F 1 et F 3) puis par un mélange acétone-eau (95-5) (filtrats F 2 et F 4).

Tous les filtrats F 1, 2, 3 et 4 sont réunis et sont concentrés sous vide. La phase résiduelle est donc caractérisée par sa richesse en eau.

b) *Reprise par l'acétate d'éthyle* : l'opération consiste à faire passer, le plus sélectivement possible, les gibbérellines de la phase aqueuse, résultant de la concentration précédente, dans l'acétate d'éthyle. Elle se déroule en deux temps à deux pH différents.

— pH 7 : l'éluat concentré et ajusté à pH 7 est repris par 2 l d'acétate d'éthyle. On agite pendant 2 h et décante. On sépare ainsi la phase supérieure aqueuse et l'acétate d'éthyle qui est conservé au froid.

— pH 2 : la phase aqueuse, résultant de la décantation précédente et ajustée à pH 2, est reprise par 4 l d'acétate d'éthyle. On agite et décante comme ci-dessus.

Les phases aqueuses ayant été éliminées, les deux fractions d'acétate d'éthyle correspondant aux deux pH, sont finalement réunies et concentrées sous vide à basse température jusqu'à ce que le volume de liquide soit amené à 10 ml : il présente une coloration jaune-verdâtre, il est prêt pour la chromatographie.

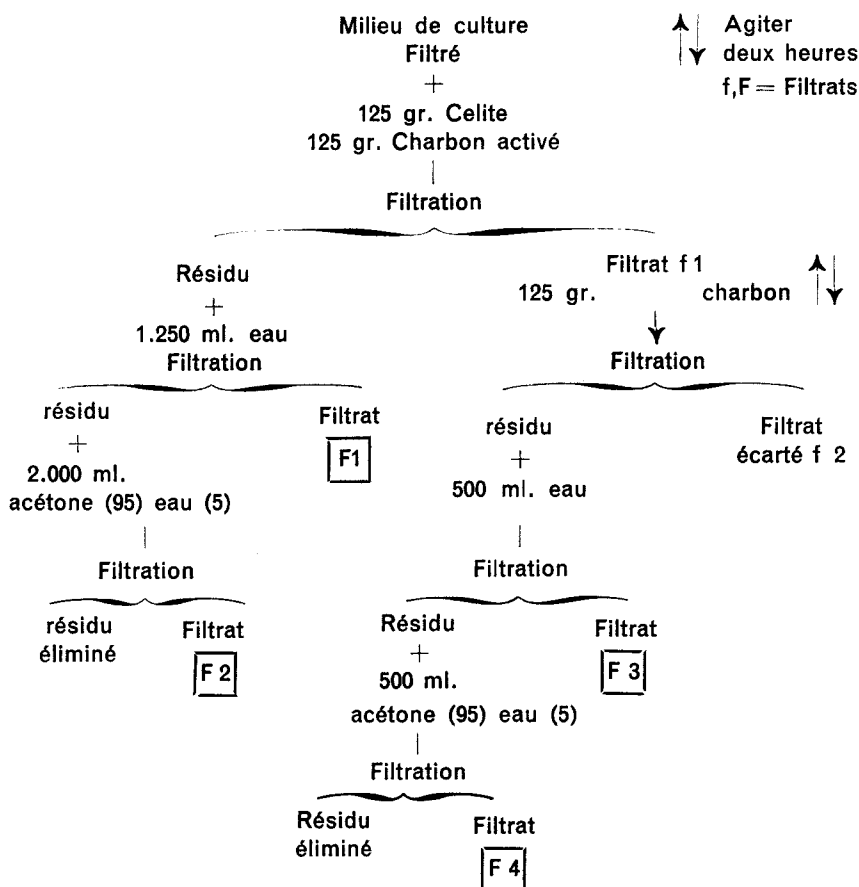


FIG. 18. — Résumé schématique des diverses opérations d'extraction des gibbérellines : adsorption - élution.

B) SÉPARATION CHROMATOGRAPHIQUE.

C'est en fonction d'une séparation parfaite entre l'acide gibbérellique et l'acide indole-acétique, susceptible d'avoir été extrait simultanément, que nous avons choisi un système solvant.

Le mélange préconisé par MITCHELL (1958) pour la chromatographie descendante comprend :

acétone	25 ml
N butanol	25 -
alcool amylique tertiaire.	25 -
ammoniaque	10 -
eau distillée	15 -

Il donne de bons résultats : le Rf de l'acide gibbéréllique est compris entre 0,43 et 0,57, mais la révélation fait apparaître des traînées qui pourraient : d'une part, provoquer une perte de substance et, d'autre part, interférer avec l'acide indole-acétique.

L'acétate de butyle saturé d'eau sépare très bien en chromatographie ascendante les deux acides mais l'acide gibbéréllique migre très peu (Rf 0,1) et risque par conséquent de n'être pas parfaitement distinct de la tache initiale.

Le solvant qui finalement nous a donné les meilleurs résultats et que nous avons retenu, est le mélange :

benzène	3 parties
pyridine	6 -
ammoniaque	1 -

En chromatographie ascendante le Rf de l'acide indole-acétique (0,30 à 0,44) et celui de l'acide gibbéréllique (0,13 à 0,24) sont voisins, mais la séparation est nette et, à la révélation, il n'apparaît pas de traînées.

Sur les bandes de papier Watman n° 1 on dépose en plusieurs fois un volume total d'extrait à analyser de 0,1 ml. La chromatographie ascendante conduite dans une cuve de type Shandon dure 16 h au bout desquelles le front de liquide a parcouru 35 cm.

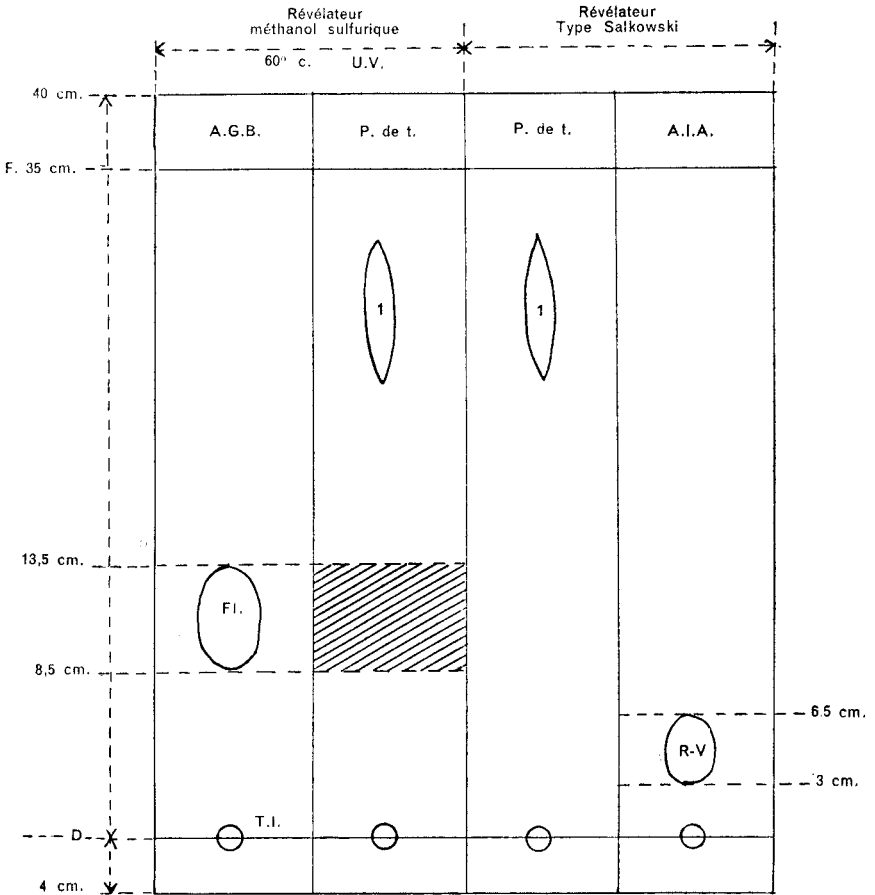
Différents révélateurs ont été préconisés pour la mise en évidence de l'acide gibbéréllique sur les chromatogrammes ; nous avons utilisé le méthanol sulfurique à 3 % additionné de 0,05 % de perchlorure de fer (RAPPAPOET et SMITH, 1962). La pulvérisation de ce mélange est suivie d'un chauffage à 60° pendant 5 mn. A la lumière du jour seul l'acide β -indole-acétique présente une coloration violette ; l'acide gibbéréllique n'est pas visible (il le deviendrait en chauffant à 100° C au lieu de 60° C).

En lumière ultra-violette (spectroline lamp SL 3.660 long wave) la tache de gibbérélline présente une fluorescence bleu-vert tandis que, dans ces conditions, l'acide indole-acétique n'est pas fluorescent. La coloration de l'acide gibbéréllique en U.V. n'apparaît que pour une concentration de 10^{-5} (fig. 19, p. 124).

C) TEST BIOLOGIQUE.

Les concentrations des milieux que nous avons à examiner étant inférieures à celles que nous venons de signaler ci-dessus, nous avons eu recours à ce que la littérature anglo-saxonne appelle « *Avena leaf base section test* » (RADLEY, 1958 ; VAN OVERBEEK et DOWDING, 1961). Ce test repose sur l'élongation de portions bien déterminées de jeunes pousses. Après divers essais, c'est la variété d'avoine « Brighton » dont nous disposons au laboratoire pour des dosages d'auxine, que nous avons retenue. En effet, cette variété s'est montrée également très intéressante pour le test des gibbéréllines en raison de la présence sur le coléoptile d'un nœud très visible et assez éloigné du caryopse.

Les sections sont effectuées sur des jeunes pousses âgées de 6 à 7 jours et ayant atteint 6 à 7 cm de longueur. La fig. 20, p. 125 montre l'endroit exact du prélèvement : la longueur des segments coupés est de




- | | | | |
|---|---|---------------|--|
|  | Partie non révélée : ultérieurement soumise au test biologique. | 1 | = Trainée jaune vert (solanine). |
| Fl. | = Fluorescence. | T.I. | = Tache initiale. |
| A.G.B. | = Acide gibbérellique. | D. | = Ligne de départ. |
| P. de t. | = Extrait de pomme de terre. | F. | = Front du solvant (chromatographie ascendante). |
| | | R.V. | = Coloration rose-violet. |
| | | A.I.A. | = Acide indole-acétique. |

FIG. 19. — Chromatographie d'extraits de pomme de terre. Dispositions et résultats. — Solvant : benzène-pyridine-ammoniaque.

8 mm ; la coupure inférieure est effectuée à 2 mm sous le nœud. On reçoit les fragments dans l'eau et après 4 h, à l'extrémité de certaines sections, on peut percevoir une légère sortie de la feuille ; seuls ces derniers types de section sont utilisés pour le test.

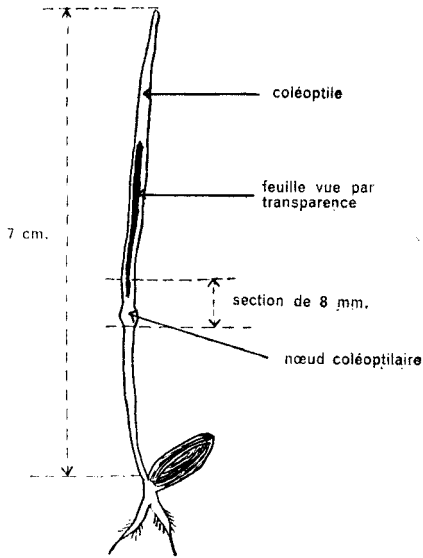


FIG. 20. — Dosage biologique des gibbérellines. Prélèvement des sections de feuilles d'*Avena*.

- Le test proprement dit consiste à placer dans un petit cristalliseur :
- le morceau de chromatogramme correspondant à la migration de l'acide gibbérellique déposé à titre de témoin de part et d'autre de la tache à analyser ;
 - 2,5 ml de tampon phosphate (pH 6,2) ;
 - 4 à 5 gouttes de Tween 20.

Finalement après 12 h de séjour à 4° C on ajoute dans chaque récipient 12 sections de coléoptiles préparés comme sus indiqué. Naturellement un témoin, renfermant seulement la solution tampon et le Tween, reçoit également 12 sections de coléoptile.

L'ensemble séjourne 48 h dans une étuve à 25° C.

Ce temps écoulé, la feuille sort du fragment de coléoptile (*pl. XI*) et son allongement, que nous mesurons par un procédé photographique constitue une réponse spécifique de l'acide gibbérellique (VAN OVERBEEK et DOWDING, 1961). Des essais réalisés par ces auteurs et que nous confirmons montrent que l'acide indole-acétique et ses précurseurs n'ont pas d'action sur le test.

Pour étudier la sensibilité de ce test nous avons appliqué l'ensemble de ces techniques (chromatographie et test biologique) à des concentrations d'acide gibbérellique allant de 10^{-2} à 10^{-10} . Ceci permet d'établir une courbe de réponse (*fig. 21, p. 126*) qui montre que la sensibilité

de cette méthode est très grande puisqu'elle permet de déceler, dans les conditions expérimentales définies, une concentration de l'ordre de 10^{-10} . Dans le cadre de ce paragraphe, nos préoccupations sont surtout d'ordre qualitatif. Lorsque nous serons amené à utiliser cette courbe d'étalonnage dans un but quantitatif nous donnerons quelques précisions supplémentaires.

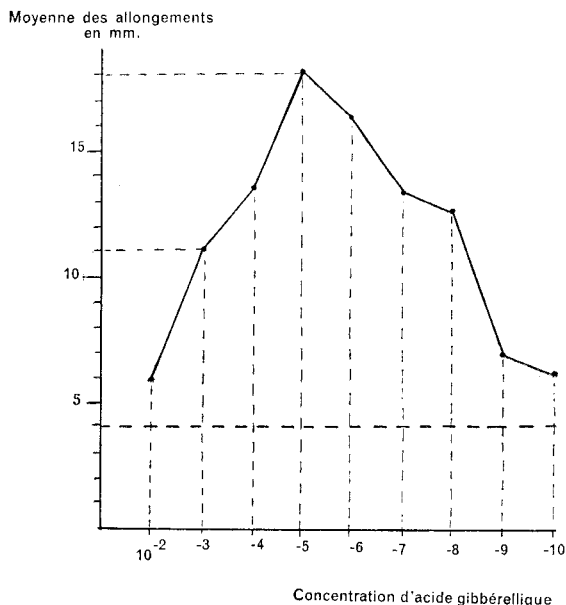


FIG. 21. — Variation des allongements de la feuille d'*Avena* en fonction de concentrations décroissantes d'acide gibbérélique.

D) RÉSULTATS.

On voit (tableau 50, p. 127) que les allongements obtenus à partir des milieux de culture sont toujours supérieurs à ceux des témoins.

Il existerait donc dans les produits du métabolisme de toutes les bactéries citées ci-dessus des substances stimulatrices de l'allongement de la feuille d'avoine. La méthode d'extraction, la purification chromatographique et la spécificité des essais biologiques conduisent à penser que ces substances appartiennent au groupe des gibbérélines.

Il est intéressant pensons-nous de remarquer que les deux espèces le plus fréquemment isolées des végétaux (*Bacillus licheniformis* et *B. cereus*) sont aussi celles qui ont donné les allongements les plus forts.

Ainsi nos travaux établissent que des bactéries cultivées en présence de tryptophane dans un milieu identique à celui qui permet la synthèse de dérivés auxiniques, élaborent des composés très complexes

du groupe des gibbérellines. Celles-ci participeraient donc aussi bien au métabolisme des végétaux supérieurs qu'à celui des bactéries ; ceci pourrait faciliter l'étude des voies de synthèse des gibbérellines en biologie générale.

Espèces bactériennes	Moyenne des allongements en mm.
Témoin	4
<i>Bacillus megaterium</i>	6,2
<i>Pseudomonas</i> non pigmenté	7,2
<i>Flavobacterium sp.</i>	7,6
<i>Pseudomonas</i> pigmenté	7,8
<i>Bacillus pumilus</i>	9,7
<i>Bacillus cereus</i>	11,1
<i>Bacillus licheniformis</i>	14,4

Tableau 50. — *Elongation moyenne des feuilles d'avoine provoquée par des extraits bactériens.*

Nous avons en outre cherché à vérifier ces résultats par le test du pois nain (Mc COMB et CARR, 1955). Les fragments de chromatogramme correspondant au Rf de l'acide gibbéréllique sont repris par 2,5 ml d'eau distillée additionnée de 4 à 5 gouttes de Tween 20 à 0,05 %. A quatre reprises on applique une goutte de la solution précédente entre les deux jeunes feuilles situées de part et d'autre de l'extrémité apicale de pois nains var. « Annonay » cultivés en serre et âgés de 15 jours au moment de l'application.

Dans un même pot, toutes les plantes sont traitées par l'extrait d'une même souche. Des extraits identiques aux précédents mais réalisés à partir de milieux de culture non ensemencés sont appliqués à des plantes qui nous servent de témoin.

Les résultats sont visibles sur la *pl. XI*. Les plantes développées en présence d'extraits bactériens présentent par rapport au témoin, un net allongement des entre-nœuds et une coloration plus claire du feuillage. Ces caractères sont bien ceux que l'on observe généralement après traitement des plantes par les gibbéréllines.

Certes, il conviendrait d'étudier ultérieurement avec plus de précision la nature des gibbéréllines existant dans ces extraits ; la méthode que PHINNEY (1961) a mise au point grâce aux mutants nains du maïs (dwarfs 1, 2, 3, 5) permettrait sans doute d'y parvenir. Nous pouvons cependant conclure à la présence dans les milieux de culture de substances de type gibbérélline puisque, nous l'avons vérifié, ce test n'est pas sensible à l'action de l'acide indole-acétique.

II. — ÉTUDE DES SYNTHÈSES *IN VIVO*

Les micro-organismes isolés des organes végétaux sont donc capables, nous venons de le voir, de synthétiser *in vitro* des substances de croissance que les physiologistes s'accordent à considérer comme importantes pour la régulation d'un grand nombre de mécanismes.

Cette synthèse est-elle possible *in vivo*, c'est-à-dire, en ce qui nous concerne, au sein des tubercules de pomme de terre ? En d'autres termes peut-on établir, en effectuant des mesures à différents moments de l'évolution des tubercules, une relation entre la teneur en auxine et en gibbérelline des organes et le niveau du peuplement bactérien correspondant ?

Certes, nous savions bien, en commençant cette partie de notre travail qu'il serait très difficile d'aboutir à une indication atteignant un haut degré de certitude. Si des relations entre les substances de croissance et les bactéries existent *in vivo* elles ne pourront être définies sérieusement qu'à la suite d'un grand nombre d'études.

Quoi qu'il en soit puisque nous possédions des indications chiffrées sur l'évolution de la population bactérienne au sein des tubercules placés dans diverses conditions de conservation, il ne restait qu'à effectuer dans les tubercules correspondants les dosages d'auxine et de gibbérelline avec lesquels nous nous étions familiarisé. Pourtant il fallait donner à ces analyses, effectuées jusqu'ici sous l'angle simplement qualitatif, une valeur quantitative.

Pour les gibbérellines nous y sommes parvenu de façon simple en utilisant la partie de la courbe d'étalonnage (*fig. 21, p. 126*) comprise entre 10^{-5} et 10^{-10} . En effet, la quantité de gibbérelline extraite des tubercules n'est jamais suffisante pour atteindre la concentration de 10^{-5} nécessaire pour que la fluorescence apparaisse sur les chromatogrammes ce qui élimine presque entièrement la partie ascendante de la courbe (allongements augmentant avec la concentration) de 10^{-2} à 10^{-6} .

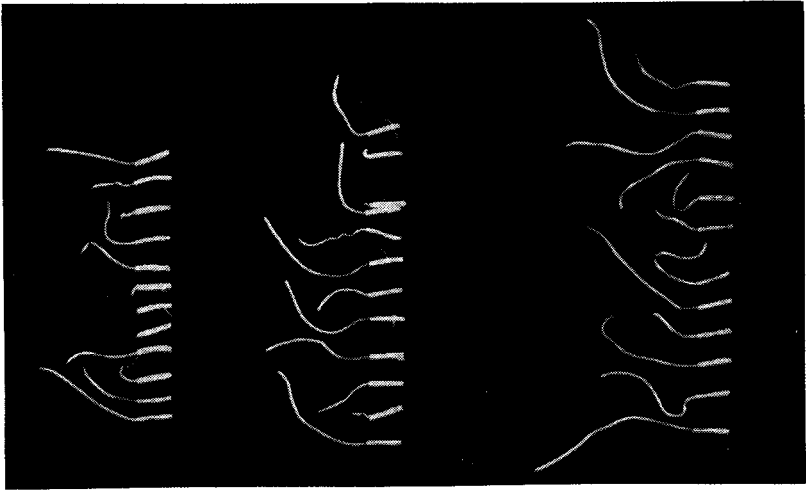
Pour les auxines les mesures colorimétriques et l'appréciation par électrophorèse étaient bien insuffisantes pour convenir à cette nouvelle étude : nous avons donc eu recours à un dosage biologique.

1^o Matériel végétal.

Nous avons mené cette étude tout à fait parallèlement à celle qui a été consacrée à l'évolution de la population bactérienne et que nous avons rapportée ci-dessus. Les tubercules appartiennent à la variété Sirtema, ils sont répartis en 3 lots soumis chacun, entre le 4-X-63 et le 17-I-64, à des conditions variables de conservation décrites plus en détail précédemment.

Le premier lot est conservé dans un local où la température reste voisine de 15° C.

Le second est continuellement maintenu au froid (4° C à 6° C).



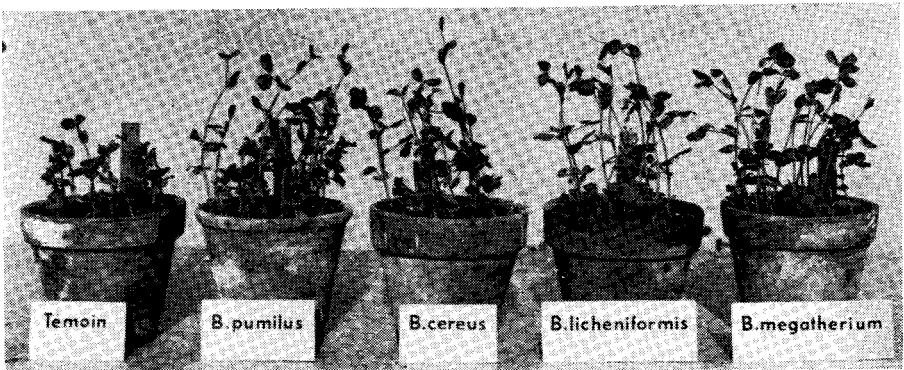
0

10⁻¹⁰

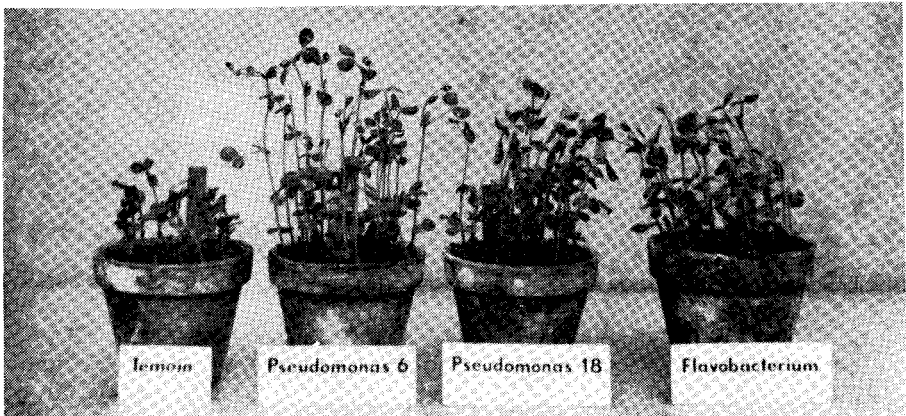
10⁻⁶

Acide Gibbérellique 48 h

1



2



3

1 : *Avena* leaf base section test : action de deux concentrations de gibbérelline.
2 et 3 : Action de filtrats de cultures bactériennes sur la croissance du pois nain.

La germination du troisième lot, enfin, est retardée par un inhibiteur chimique, l'iso-propyl-phényl-carbamate.

Les dosages sont effectués tous les quinze jours dans chacun des lots

2° Substances auxiniques.

A) MÉTHODES DE DOSAGE.

a) *Extraction* : HEMBERG (1948, 1949) a montré que les substances de croissance sont plus abondantes dans le cortex et que leur évolution dans cette zone suit celle de l'ensemble du tubercule. C'est pourquoi, après avoir enlevé les germes des tubercules, nous n'avons utilisé que la partie périphérique correspondant au périoderme et au parenchyme cortical.

Les tissus définis ci-dessus sont prélevés, coupés en menus fragments dont on pèse 300 g qui sont immédiatement plongés dans 300 ml d'éther éthylique anhydre et dépourvu de peroxydes. L'extraction se poursuit ainsi pendant 48 h à 4° C. La solution éthérée est filtrée, évaporée sous vide à basse température et le résidu compris par 1 ml d'éther.

b) *Séparation* : elle est réalisée par chromatographie ascendante selon NITSCH et NITSCH (1956) ; NITSCH (1956) ; BENNET-CLARK, TAMBIAH et KEFFORD (1952 et 1953), sur papier Watman n° 1, pendant 20 h à la température du laboratoire. L'éluant est le mélange (v/v) isobutanol (80), méthanol (5) et eau (15). Les dérivés indoliques sont mis en évidence, pour identification, par pulvérisation, sur les chromatogrammes séchés, des réactifs classiques de Salkowski et d'Erlich.

c) *Test biologique* : pour doser les substances de croissance nous nous sommes adressés selon BONNER (1949) et NITSCH et NITSCH (1956) au test d'élongation des coléoptiles d'avoine de la variété Brighton (1)

A la température de 15° C, après 60 h de développement dont 3 en lumière rouge et le reste à l'obscurité, les coléoptiles atteignent une longueur de 30 mm. On prélève, à 3 mm de l'apex, un fragment de 5 mm de longueur. Les segments de coléoptiles sont recueillis et séjournent pendant 3 h dans une solution aqueuse à 0,1 % de $Mn SO_4 \cdot H_2O$.

Par ailleurs les chromatogrammes sont découpés en 30 bandelettes transversales de 1 cm de largeur. Chacune d'elle, placée dans un petit récipient, reçoit 1,5 ml d'une solution glucosée à 2 %, tamponnée à pH 5 et additionnée de Tween 80 à raison de 0,1 %.

Après 24 h de séjour au réfrigérateur, on ajoute 10 sections de coléoptiles à chaque récipient que l'on place alors à l'obscurité pendant 20 h dans une étuve à 25° C. On calcule ensuite, après avoir mesuré la longueur de chaque segment par un procédé photographique, les valeurs moyennes des allongements que l'on exprime en pourcentage par rapport à ceux des témoins.

(1) Nous tenons à remercier la station de SCOTT, Saskatchewan, Canada qui nous a aimablement fourni cette variété.

On peut certes faire quelques réserves à propos des diverses méthodes employées : extraction incomplète par l'éther, dégradation pendant la chromatographie, oxydation des substances de croissance pendant le test biologique (PILET, 1961). Pour toutes ces raisons nous n'attribuons pas à ces dosages une valeur absolue mais simplement relative.

La sensibilité de ce test a été étudiée par NITSCH et NITSCH (1956) qui ont pu mettre en évidence l'acide indole-acétique jusqu'à la concentration de 10^{-9} .

B) RÉSULTATS.

Le découpage de la totalité des chromatogrammes en 30 fragments de 1 cm nous a permis de doser plusieurs substances auxiniques présentes dans les extraits et actives sur le test (acide indole-pyruvique, acide indole-acétique, acide indole-butyrique, indole-acétaldéhyde, indole-acétonitrile). Nous avons présenté ailleurs l'ensemble de ces résultats (MONTUELLE et CORNETTE, 1964) d'un point de vue différent de celui qui nous retient ici. Nous avons montré que, même en période de repos végétatif les tubercules sont le siège de transformations et de synthèses auxiniques importantes. La conservation au froid freine la formation des acides indole-acétique et indole-butyrique mais n'empêche pas celle de l'indole-acétonitrile qui s'accumule. L'isopropyl-phényl-carbamate ralentit toutes les synthèses auxiniques. Enfin, l'acide indole-butyrique est constamment présent dans les extraits.

Dans le cadre de ce travail nous n'avons gardé des résultats des dosages biologiques effectués sur les 3 lots que ceux qui concernaient l'acide indole-acétique. Nous les avons représentés aux *fig. 22, 23, 24*, en même temps que la transcription de l'évolution correspondante de la population bactérienne. En abscisse sont portées les dates d'extraction et de dénombrement ; en ordonnée pour l'acide indole-acétique les pourcentages d'allongement des coléoptiles par rapport à ceux des témoins, et, pour les bactéries les résultats des dénombrements en milieu solide.

L'observation de ces 3 groupes de courbes permet de constater que les deux phénomènes étudiés évoluent de façon parallèle.

Pour le lot 1 conservé à 15° C (*fig. 22*) les parties ascendantes et descendantes des deux courbes correspondent bien : le maximum est atteint le 13-XII.

Pour le lot 2 conservé à 4° C (*fig. 23*) les variations sont beaucoup moins importantes mais, dans l'un et l'autre cas, elles se correspondent encore.

Enfin, pour le lot 3 traité par l'isopropyl-phényl-carbamate (*fig. 24*) les phénomènes sont encore parallèles au moins pendant la seconde partie de l'expérience.

3^o Gibbérellines.

A) MÉTHODES DE DOSAGE.

Comme pour l'auxine les dosages sont effectués tous les quinze jours et en correspondance avec les analyses de population bactérienne.

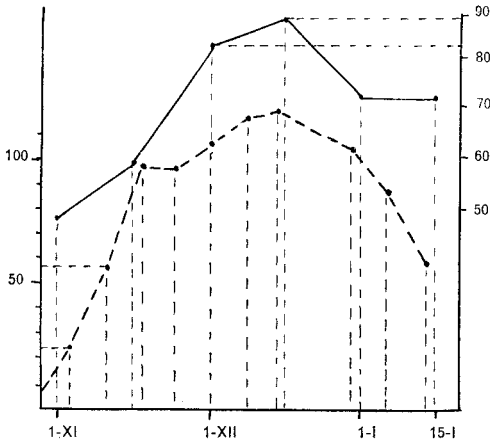


FIG. 22. — Conservation « naturelle » à 15° C.

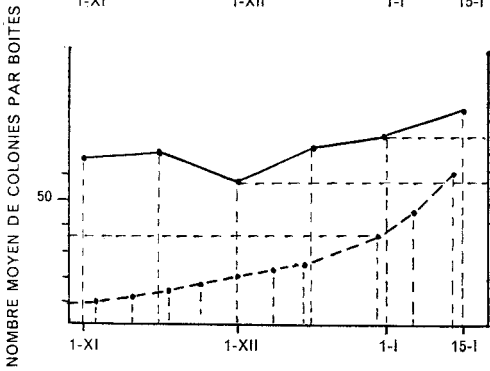


FIG. 23. — Action du froid continu.

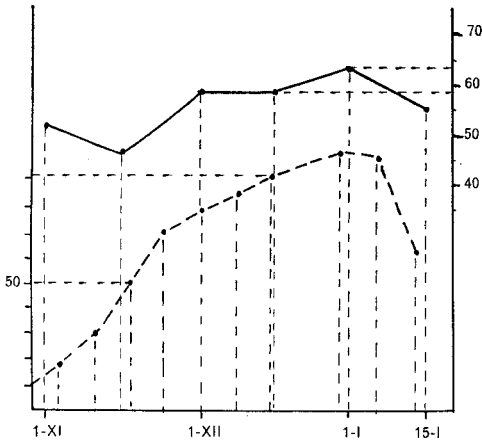


FIG. 24. — Action de l'isopropyl - phényl - carbamate.

— Auxine
 - - - - - Population bactérienne.

FIG. 22 à 24. — Relations, dans diverses conditions, entre la population bactérienne et la teneur auxinique.

Les tissus prélevés comme ci-dessus sont placés dans un mélange *v/v* d'acétone (85) et d'eau (15), à raison de 500 g d'organe pour 750 ml de liquide. L'extraction est poursuivie au réfrigérateur à 4° C pendant 72 h. Après filtration le filtrat est soumis à l'ensemble des traitements que nous avons exposés plus haut (*p.* 121) et schématisés (*fig.* 18, *p.* 122).

B) RÉSULTATS.

Ils sont exprimés aux *fig.* 25, 26, 27, *p.* 133. En abscisse sont portées les dates d'extraction et de dénombrement. En ordonnée pour les gibbérellines les allongements moyens des sections de feuilles et pour les bactéries les résultats des dénombrements en milieu solide.

Au cours de la conservation à 15° C (*lot* 1, *fig.* 25) l'évolution de la quantité de gibbérelline et celle du nombre de bactéries sont tout à fait parallèles. La population bactérienne est maximale pendant la période qui s'étend environ du 10 au 25 déc. ; elle correspond également à une teneur en gibbérelline importante.

Le séjour au froid continu (*lot* 2, *fig.* 26) freine beaucoup, nous l'avons vu, le développement des bactéries qui cependant commencent à proliférer à partir de la fin décembre : on voit que la teneur en gibbérelline commence à augmenter notablement un peu après, c'est-à-dire vers le 10 janvier.

Lorsque les tubercules ont été traités par l'iso-propyl-phényl-carbamate (*lot* 3, *fig.* 27) la progression de l'augmentation du nombre des bactéries est assez lente mais régulière du 30-X au 8-I. Au point de vue des gibbérellines il y a, dans les quinze premiers jours qui suivent l'application du traitement (15-X) une élévation de teneur importante qui n'est pas rattachée à une évolution correspondante du nombre de bactéries ; mais, à partir du 26-XI la corrélation entre les variations des deux phénomènes étudiés est très bonne.

III. — CONCLUSIONS

Beaucoup de micro-organismes sont, *in vitro*, capables de produire de l'acide indole-acétique. Nos recherches personnelles effectuées également *in vitro* ont révélé : d'une part, que cette propriété était fréquente chez les bactéries isolées d'organes végétaux et, d'autre part, que celles-ci étaient en outre capables de synthétiser des substances du groupe des gibbérellines.

Cependant, les produits qui entrent dans la composition du milieu de culture synthétique ne sont pas très éloignés de ceux qui, dans les organes vivants, peuvent être à la disposition des micro-organismes (sels minéraux, tryptophane, pyruvate, glucose). Il semble donc vraisemblable de penser que ces synthèses, dont la possibilité a été démontrée *in vitro*, se produisent également *in vivo*.

Lorsque nous avons rapproché et comparé d'un côté les dénombrements bactériens et de l'autre les résultats correspondants des dosages

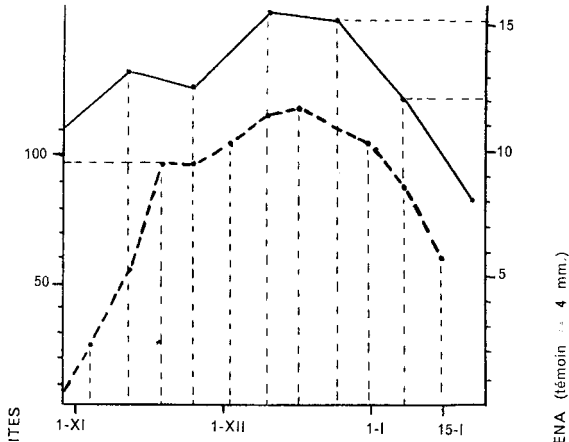


FIG. 25. — Conservation « naturelle » à 15° C.

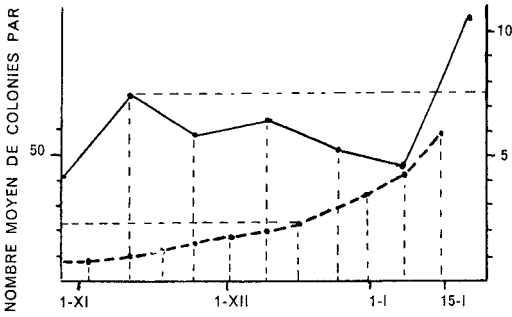


FIG. 26. — Action du froid continu (4° C).

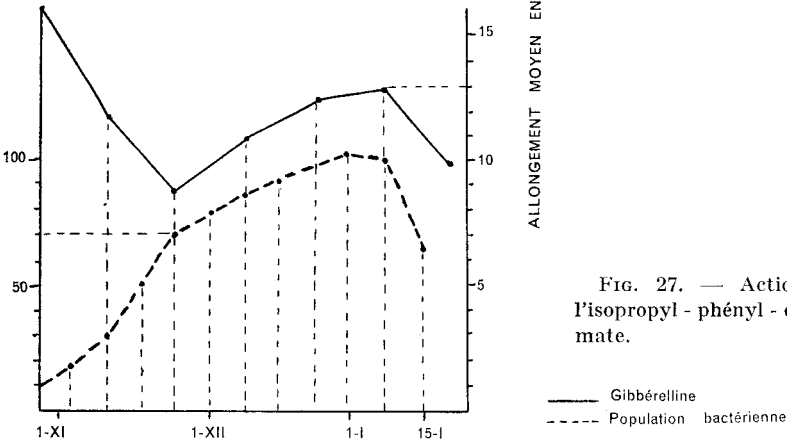


FIG. 27. — Action de l'isopropyl - phényl - carbamate.

FIG. 25 à 27. — Relations, dans diverses conditions, entre la population bactérienne et la teneur en substances de type gibbérelline.

d'auxine et de gibbérelline, nous avons constaté que la teneur en ces deux substances de croissance, variait, dans des conditions physiologiques différentes, de la même façon que le nombre de micro-organismes.

Existe t-il dans ces conditions une relation directe, quantitative, de cause à effet entre les bactéries et les substances de croissance au sein des tubercules de pomme de terre ? Il est difficile de l'affirmer. Il pourrait s'agir, en effet, d'une simple corrélation dans le temps qui résulterait d'une même sensibilité à un facteur commun. D'autre part, il semble difficile de penser que les faibles variations du nombre de bactéries puissent déterminer à elles seules des différences aussi importantes que celles que nous avons mesurées dans la teneur en auxine et gibbérelline.

Mais cependant, compte tenu de l'intervention des substances de croissance même à très faibles doses dans de nombreux mécanismes physiologiques, il ne faut pas négliger, pensons-nous, la part que pourraient prendre, localement peut-être, les micro-organismes dans le métabolisme de la plante hôte. Il va de soi, bien entendu, que, même si la synthèse d'auxine et de gibbérelline par les bactéries *in vivo* était établie de façon péremptoire, nous n'en considérerions cependant pas pour autant les micro-organismes comme la seule source de ces substances.

L'hypothèse de l'intervention ne reçoit donc, par ces expériences ni confirmation ni infirmation définitive : elle reste seulement plausible.

CHAPITRE VI

Action de diverses substances, notamment d'antibiotiques sur le bourgeonnement des tubercules de pomme de terre.

L'unité du chapitre que nous abordons maintenant repose essentiellement sur l'utilisation d'une même technique d'ailleurs très simple : nous faisons agir différents produits en solution sur des tubercules mis en conditions de germination et examinons les modifications qui en résultent.

Pour étudier l'intervention éventuelle des micro-organismes dans la vie de l'hôte une méthode théorique vient naturellement à l'esprit : supprimer les bactéries, enregistrer les répercussions sur le métabolisme de la plante supérieure et en tirer des indications physiologiques sur les rapports existant entre les deux organismes. Mais, en fait, le problème n'est cependant pas si simple car il faut que l'action d'un produit donné sur les micro-organismes soit sélective, c'est-à-dire qu'elle n'ait pas d'incidence directe sur le comportement physiologique de la plante supérieure.

Dans cette perspective les antibiotiques ont, bien entendu, en premier lieu retenu notre attention. Nous avons essayé successivement : la kanamycine, la néomycine, la spécilline, le chloramphénicol, les sulfamides.

D'autre part, le chapitre précédent ayant établi que les bactéries étaient susceptibles de produire des substances de croissance notamment auxine et gibbérélline, nous avons étudié l'action que ces composés pourraient avoir sur le bourgeonnement.

Enfin, dans une troisième et dernière partie nous avons fait agir successivement et sur le même tubercule ces deux catégories de produits : antibiotiques et substances de croissance.

I. — MODE OPÉRATOIRE

Tous les travaux ont été réalisés sur des pommes de terre de plant var. Bintje, classe A, calibrées à 28-35 mm. Afin de s'assurer d'une certaine homogénéité dans le matériel, les tubercules sont, à partir de novembre conservés au réfrigérateur (4° - 6° C) et n'en sont sortis qu'au début de chaque expérience.

Chaque organe est lavé, coupé transversalement (perpendiculairement au grand axe) de façon à ce que la hauteur de la partie apicale, seule utilisée en raison de sa richesse en « yeux » ou bourgeons, soit sensiblement constante (30 à 40 mm). La partie distale par laquelle l'organe se rattachait aux stolons est toujours éliminée.

Les morceaux de tubercule ainsi obtenus sont posés sur la surface de coupe dans de petits cristallisoirs (40 mm de diamètre) dans lesquels on introduit la solution à étudier (fig. 28).

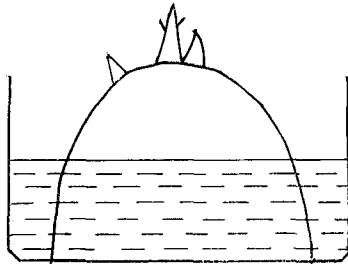


FIG. 28. — Partie apicale d'un tubercule de pomme de terre baignant dans la solution à étudier.

Nous appelons série un ensemble de 10 tubercules sectionnés comme ci-dessus et soumis à une concentration et une durée donnée d'un même produit. Dans chaque cristallisoir on verse 10 ml de la solution à étudier ou d'eau distillée (témoin). On laisse à la température ambiante et on rajoute, au fur et à mesure du déroulement de l'expérience, indifféremment dans tous les cristallisoirs, de l'eau distillée pour compenser l'évaporation.

En cours d'expérience nous notons :

- les dates d'apparition des bourgeons et des ramifications latérales ;
- la pilosité et la pigmentation.

A la fin des expériences, c'est-à-dire généralement après 30 jours, nous examinons les bourgeons et en mesurons :

- le nombre,
- la longueur,
- le poids frais,
- le poids sec.

Toutes ces observations sont toujours, dans chaque expérience, corrélativement effectuées sur une série témoin.

II. — ACTION DES ANTIBIOTIQUES

1° Kanamycine.

Cet antibiotique obtenu à partir des cultures de *Streptomyces Kanamycetus* a semblé particulièrement bien convenir à nos recherches puisque, d'une part, il possède un très large spectre antibactérien comprenant la plupart des bactéries Gram + et Gram — et que, d'autre part, sa stabilité en solution est très grande.

Nous nous sommes d'abord assuré de la bonne pénétration du produit dans les tissus des tubercules de pomme de terre par la méthode classique des antibiogrammes : on teste les propriétés antibiotiques d'un fragment immergé dans une solution de l'antibiotique.

Nous avons ensuite vérifié qu'au cours de cette pénétration il y avait bien destruction des micro-organismes. Les dénombrements bactériens sont effectués en milieu solide à intervalles réguliers à partir de tubercules ayant séjourné des temps variables dans une solution de sulfate de kanamycine à 0,02 %. Pour atténuer les causes d'erreur ou d'imprécision dues à ce que les explantats pourraient contenir de la kanamycine, on fait précéder le dénombrement proprement dit déjà décrit (p. 82) d'un séjour de chaque explantat dans un tube d'eau distillée stérile.

Les résultats sont donnés au *tableau 51*.

Durée de l'immersion en jours	Nombre de colonies dans chaque boîte de Pétri	Moyenne
0	32. 78. 69. 103. 81. 83.	74
1	43. 8. 29. 31. 27. 19.	26
2	16. 22. 39. 14. 30. 7.	21
4	22. 18. 6. 15. 9. 21.	15
7	5. 3. 2. 0. 3. 2.	2
10	1. 0. 0. 2. 0. 0.	0

Tableau 51. — *Influence de l'immersion des tubercules dans une solution de kanamycine sur le nombre de bactéries hébergées.*

La courbe (*fig. 29, p. 138*) traduit les variations du nombre de bactéries en fonction de la durée de l'immersion dans la solution de kanamycine.

La vitesse de pénétration du produit est, on le voit, assez grande et son action bactériostatique est très efficace puisque dès le premier jour de l'immersion le nombre de colonies par boîte a considérablement baissé. Nous avons rappelé sur le même graphique les résultats de l'immersion dans le sublimé (courbe en ---) ; certes, l'utilisation de ces deux produits aboutit à des résultats identiques mais, en raison sans doute de la plus grande rapidité de pénétration de l'antibiotique, l'augmentation passagère de la population bactérienne, provoquée par le traitement au sublimé, ne se produit pas avec la kanamycine.

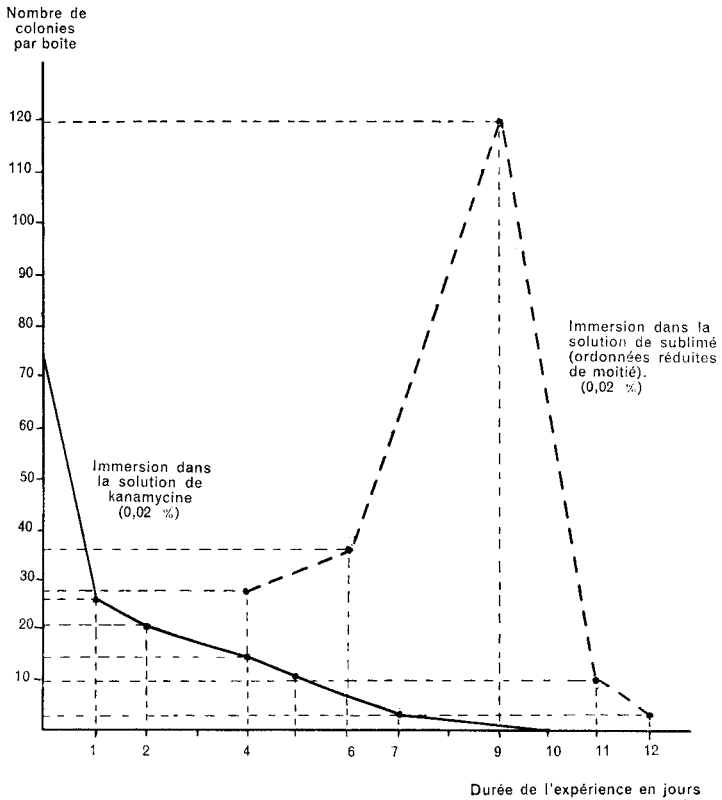


FIG. 29. — Résultats comparés des dénombrements bactériens effectués après immersion dans une solution de kanamycine ou de sublimé.

A) ACTION DE LA KANAMYCINE A DIVERSES CONCENTRATIONS.

L'essai porte sur 7 séries : 1 témoin qui reçoit de l'eau distillée et 6 concentrations différentes de kanamycine : 0,005 - 0,05 - 0,1 - 0,02 - 0,5 et 1 %. L'expérience dure 30 jours.

A mesure que la concentration augmente on note d'une façon générale que le bourgeonnement s'atténue. Si l'on entre dans le détail on constate (*fig. 30, p. 139*) que :

- le nombre de bourgeons diminue dès la concentration de 0,005 % ;
- la longueur des bourgeons est moins rapidement affectée : il faut atteindre 0,2 % et surtout 0,5 % pour que la diminution soit importante ;
- les poids frais et sec diminuent brutalement et fortement dès la concentration la plus faible ;
- à 1 % le bourgeonnement est totalement inhibé (*pl. XII, 1*).

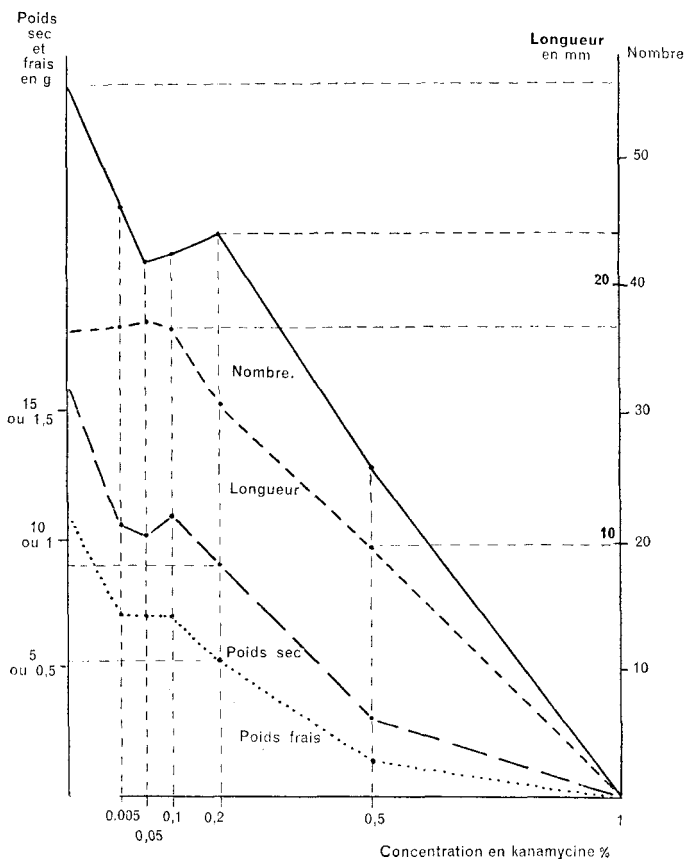


Fig. 30. — Influence de la concentration en kanamycine sur les diverses caractéristiques du bourgeonnement : nombre et longueur moyenne des bourgeons, poids frais et sec total par série.

B) APPORT DE LA KANAMYCINE DANS LES 7 JOURS QUI SUIVENT LA MISE EN EXPÉRIENCE.

Le principe de cet essai consiste à laisser s'écouler un temps variable entre le début de la mise en conditions de bourgeonnement et l'apport de kanamycine.

L'antibiotique est utilisé en solution aqueuse à 1 % : cette concentration empêcherait donc totalement le bourgeonnement si, comme dans l'expérience précédente, elle était apportée dès le premier jour.

Au départ, le jour 1, les 10 cristallisoirs d'une série reçoivent 10 ml de la solution de kanamycine ; toutes les autres séries 10 ml d'eau distillée. La série témoin est continuellement entretenue à l'eau distillée. Dans les autres séries l'eau est remplacée par la solution antibiotique au début des 2^{me}, 3^{me}, 5^{me} et 7^{me} jours d'expérience. Les résultats sont notés dans tous les cas 30 jours après le début des travaux.

La kanamycine (*fig. 31*), appliquée dès le premier jour inhibe totalement le bourgeonnement ; mais, à mesure que l'apport d'antibiotique a lieu plus tardivement, l'inhibition diminue jusqu'à s'annuler complètement (*pl. XII, 2*).

En effet, intervenant le deuxième jour la kanamycine exerce son action inhibitrice moins sur le nombre de bourgeons que sur leur longueur et leur poids. Si l'action du produit débute le troisième jour il y a encore une nette altération du bourgeonnement mais, curieusement, le nombre de pousses tend à dépasser celui des témoins : elles sont cependant plus grêles et de coloration jaunâtre ; l'action dépressive sur le poids est beaucoup moins forte que précédemment mais cependant encore notable.

Les grandeurs que nous avons mesurées (longueur, nombre et poids des bourgeons) sur des tubercules ayant été traités par l'antibiotique le cinquième jour de l'expérience sont encore légèrement inférieures à celles des témoins.

Enfin, si la kanamycine ne commence à agir qu'après 7 jours le bourgeonnement est tout à fait normal.

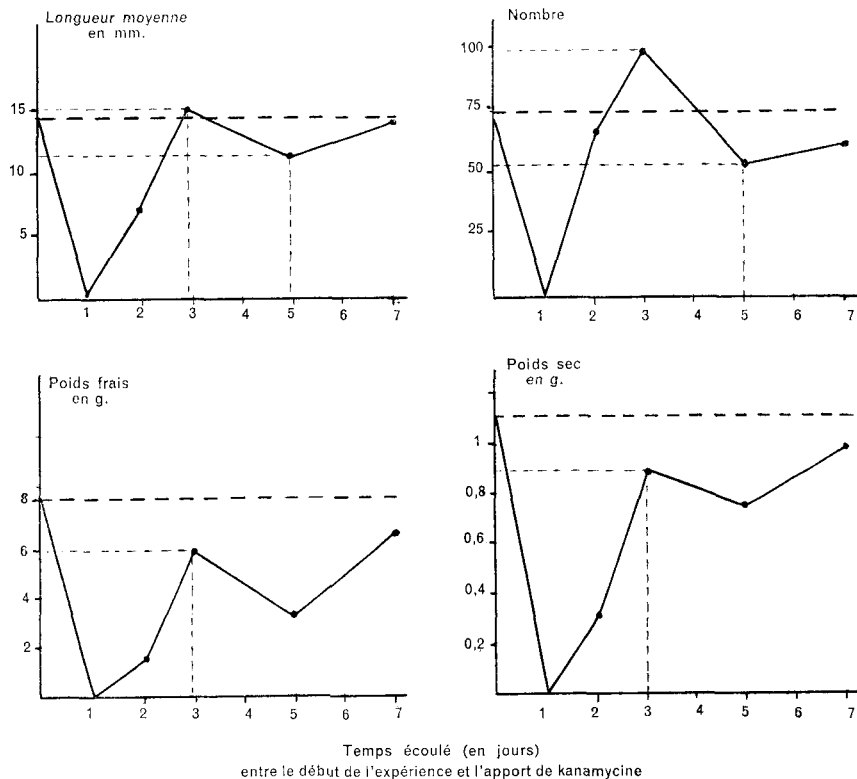


FIG. 31. — Influence d'un apport retardé de kanamycine sur les diverses caractéristiques du bourgeonnement : nombre et longueur moyenne des bourgeons, poids sec et frais totaux par série.

Par conséquent, il existe dans le déroulement de la germination des tubercules de pommes de terre une phase très précoce et très courte de sensibilité à la présence de l'antibiotique : elle commence dès la mise en conditions de bourgeonnement et ne dure pas plus de 5 jours.

Cette expérience semble donc très intéressante mais avant d'en tirer une conclusion, il fallait s'assurer que, dans les conditions expérimentales il y avait bien pénétration de l'antibiotique. En effet, lorsqu'on introduit le produit 7 jours après le début de l'expérience, c'est-à-dire 7 jours après avoir sectionné le tubercule, il a pu se former un tissu cicatriciel qui risquerait de s'opposer au passage de la kanamycine. Pour lever cette incertitude nous avons, d'une part, effectué un dosage de la kanamycine au sein des tubercules et, d'autre part, procédé à l'élimination du cal.

Pour mettre en évidence la présence de kanamycine dans les tissus des organes on place des morceaux de tubercules au sein de cristallisoirs dans de l'eau distillée pendant 6 jours, le septième jour on remplace cette eau par la solution de kanamycine, le vingtième jour on découpe dans la pomme de terre des explantats cylindriques à l'emporte-pièce. On débite ces explantats en tranches (2 à 3 mm. d'épaisseur) que l'on dispose dans une boîte de Pétri à la surface d'un milieu gélosé fraîchementensemencé avec *Bacillus cereus* (fig. 32).

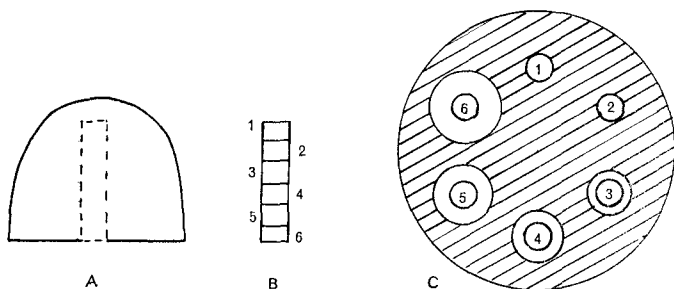


FIG. 32. — Contrôle de la pénétration de la kanamycine.
A) Prélèvement dans le tubercule. — B) Auréoles d'inhibition sur boîtes de Pétri. C) Auréoles d'inhibition sur boîtes de Pétri.

Après 24 h de séjour à l'étuve à 30° C on observe, autour des tranches de pomme de terre des auréoles d'inhibition du développement bactérien dont l'importance diminue à mesure que la tranche provient d'une région plus proche de l'extrémité apicale. Cette expérience montre qu'il y a bien, dans les conditions expérimentales définies, pénétration de la kanamycine dans la portion de tubercule étudiée.

Une autre vérification de ce fait consiste à enlever, 7 jours après le début de l'expérience au moment de l'apport de la solution de kanamycine, une tranche d'organe à la base du fragment afin d'éliminer le tissu cicatriciel formé à la suite de la première section. On constate en ce cas que le bourgeonnement de la portion de tubercule n'est pas inhibé par l'antibiotique : l'élimination du cal n'a donc pas modifié les résultats.

Par conséquent, dans l'expérience décrite au début de ce paragraphe il y a bien pénétration de la kanamycine. On peut donc puisque le bourgeonnement peut fort bien se dérouler en présence de l'antibiotique de façon tout à fait normale, considérer que ce produit (même à forte concentration) n'est pas toxique pour la plante supérieure. Il l'est par contre pour les bactéries, nous l'avons vérifié sur notre matériel. Il semble nécessaire dans ces conditions de considérer qu'intervenant dès la phase initiale de nos expériences, la kanamycine empêche totalement l'émission de bourgeons en agissant non pas directement sur le métabolisme de la plante supérieure mais par l'intermédiaire d'une action antibactérienne.

2° Néomycine.

Les propriétés thérapeutiques des antibiotiques sont bien connues en médecine, il n'en reste cependant pas moins que, dans le cadre de nos travaux, ils demeurent des produits d'origine biologique qui pourraient, en tant que tels, comporter, à côté des principes antibiotiques, des substances diverses susceptibles d'agir directement sur le métabolisme de la plante supérieure. Nous venons déjà de voir, grâce aux expériences décrites au paragraphe précédent, comment éclairer ce problème. La néomycine nous donne à son tour la possibilité d'apporter de nouveaux éléments dans cette étude. En effet, cet antibiotique d'origine fongique, préparé à partir d'un Actinomycète : *Streptomyces fradiae* n'est actif sur de nombreuses bactéries Gram + ou Gram — que si le pH est légèrement alcalin ; à pH acide, aux concentrations normales, ce pouvoir est faible.

Des expériences symétriques, conduites : l'une, à pH 6 ; l'autre, à pH 8 (tampon phosphate) comportent chacune, selon les modalités indiquées plus haut, 4 séries correspondant aux concentrations de 0 - 0,05 % - 0,1 % - 0,2 %.

Après 30 jours de développement on remarque des différences très nettes entre les portions de tubercules développées aux différents pH.

Nous nous placerons successivement, pour analyser cette expérience à différents points de vue.

Le nombre de tubercules ayant émis des bourgeons (*fig. 33, p. 143*) reste presque constant lorsque la néomycine agit en milieu acide ; il diminue au contraire très fortement pour le pH alcalin (nécessaire à l'antibiose). Cette diminution du nombre de tubercules germés est bien attribuable à la néomycine puisque le pH à lui seul (concentration 0) ne modifie pas très sensiblement ce nombre.

En ce qui concerne, d'autre part, l'action du produit sur le nombre total de bourgeons émis par série (*fig. 34, p. 133*) elle permet de confirmer les résultats précédents : à la concentration 0,1 % il y a 27 bourgeons à pH 6 et 2 seulement à pH 8 (propice à l'antibiose). Quelle que soit la concentration il n'y a jamais à pH acide (néfaste à l'antibiose) de diminution de la capacité de bourgeonnement ; la concentration de 0,05 % semble même stimuler la formation de pousses (39).

Les résultats précédents sont encore bien plus évidents si l'on considère les variations de poids frais des bourgeons émis par les 10 tubercules d'une série (*fig. 35, p. 133*).

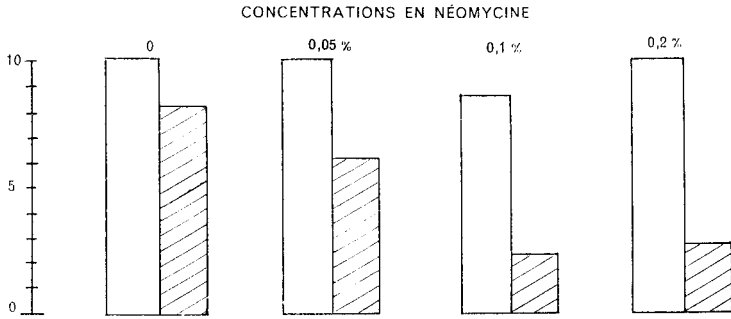


Fig. 33. — Nombre de tubercules ayant émis des bourgeons par séries.

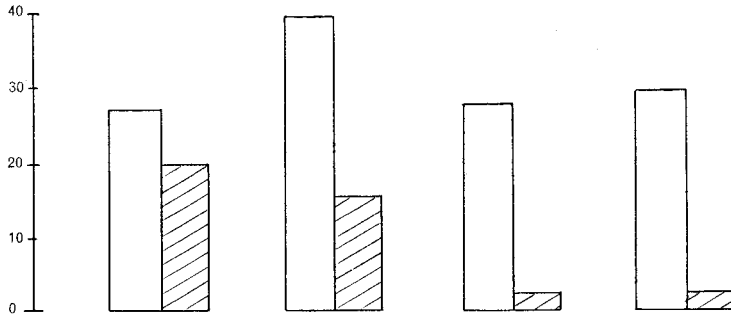


Fig. 34. — Nombre de bourgeons émis par séries.

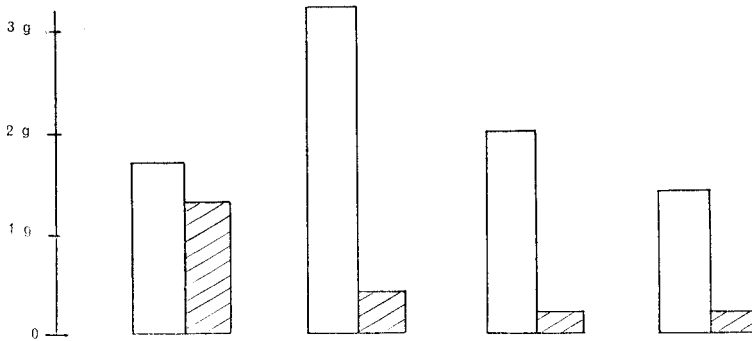


Fig. 35. — Poids des bourgeons émis par séries.

pH 6   pH 8

FIG. 33 à 35. — Influence de la néomycine sur le bourgeonnement des tubercules de pomme de terre à deux pH différents.

A pH 8 en présence de néomycine le poids des bourgeons récoltés est toujours très inférieur à celui qui est obtenu à pH 6. Les différences entre les deux pH sont ici extrêmement nettes pour toutes les concentrations même pour la plus faible : 0,05 %. Celle-ci par ailleurs provoque à pH 6 une exaltation importante du poids des pousses.

La diminution du bourgeonnement se produit seulement dans des conditions de pH où la néomycine peut inhiber les bactéries. L'action du produit découlerait donc de son pouvoir antibiotique : ce fait est de nature à renforcer l'idée d'une intervention possible des bactéries hébergées dans les mécanismes qui aboutissent à l'émission des bourgeons.

3° Spécilline.

C'est un produit de synthèse (benzylpénicillinate de sodium cristallisé). Nous l'avons utilisé aux concentrations de 0,015 - 0,03 - 0,06 - 0,1 - 0,25 - 0,5 - 1 - et 5 unités Oxford par ml.

Nous n'avons constaté aucune action ; quelle que soit la concentration de l'antibiotique, le bourgeonnement est normal.

Ces résultats négatifs pourraient s'expliquer, soit par le manque de stabilité du produit en solution, soit par son inefficacité vis-à-vis des micro-organismes présents dans les tubercules.

4° Chloramphenicol.

Le chloramphenicol est la forme synthétique d'un antibiotique, la chloromycétine, découvert en 1947 dans les produits du métabolisme de *Streptomyces venezuelae*. Des travaux récents (WEBSTER, 1957 ; BALOGH et collab., 1961 ; PEAUD LENOEL et DE GOURNAY-MATGERIE, 1962) ont montré qu'il trouble le métabolisme des acides aminés.

Nous avons fait agir cet antibiotique sur des tubercules de pomme de terre en utilisant des solutions aqueuses aux concentrations de 10^{-4} , 5.10^{-4} , 10^{-3} et 5.10^{-3} .

Ce produit est lui aussi, dans les conditions expérimentales indiquées, un inhibiteur du bourgeonnement (*fig.* 36 p. 145). Toutes les grandeurs que nous mesurons (nombre, longueur, poids des bourgeons) subissent des diminutions notables dès la concentration de 10^{-4} . L'inhibition est totale à 5.10^{-3} .

5° Sulfamethoxypyridazine.

Cette substance appartient au groupe des sulfamides ; elle est soluble dans l'eau en milieu légèrement alcalin.

Nous avons réalisé les expériences habituelles à pH 7,4 à diverses concentrations échelonnées entre 10^{-6} et 10^{-2} .

Nous n'avons constaté aucune différence entre le bourgeonnement des tubercules témoins et ceux qui avaient été soumis à l'action du produit.

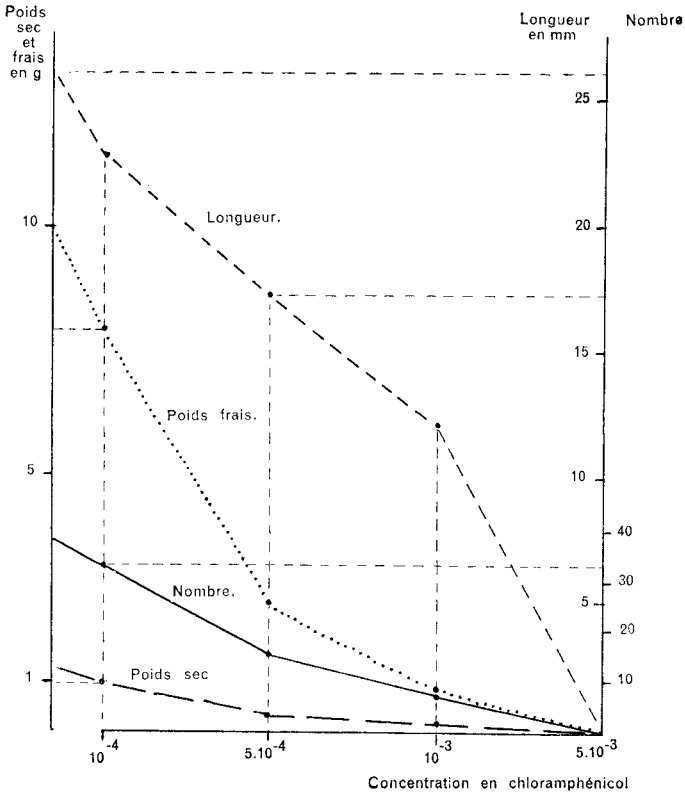


FIG. 36. — Étude de l'action du chloramphénicol sur les diverses caractéristiques du bourgeonnement des tubercules de pomme de terre.

III. — ACTION DES SUBSTANCES DE CROISSANCE

1° Acide indole-acétique.

En gardant d'une part, le processus expérimental précédent et, d'autre part, les mêmes critères d'appréciation des résultats, nous avons étudié l'action de l'acide indole-acétique sur le bourgeonnement des tubercules de pomme de terre.

Les concentrations d'acide indole-acétique s'échelonnant entre 10^{-7} et 10^{-4} n'ont provoqué aucune action notable sur les caractères étudiés.

2° Gibbérelline.

L'acide gibbérellique utilisé pour nos travaux nous a été fourni par l'Imperial Chemical Industries, il s'agit, dans la nomenclature en vigueur de G.A. 3. Il serait bien vain de présenter les gibbérellines :

le nombre de travaux qui leur sont consacrés est particulièrement élevé. A l'origine substance fongique, les travaux modernes ont montré qu'elles sont présentes en particulier dans les graines et interviennent, à très faible dose, dans un grand nombre de mécanismes physiologiques.

A) ETUDE DE L'ACTION DE L'ACIDE GIBBÉRELLIQUE A DIVERSES CONCENTRATIONS.

Nos expériences comportent 8 séries dont une témoin. Les concentrations étudiées sont les suivantes : 10^{-9} , 10^{-8} , 10^{-7} , 10^{-6} , 10^{-5} , 10^{-4} , 10^{-3} .

Les effets se font sentir très rapidement puisque dès le quatrième jour de l'expérience (*fig. 37,*) les bourgeons commencent à sortir pour les tubercules soumis aux concentrations égales et supérieures à 10^{-6} et sont en avance de 2 à 3 jours sur les témoins.



FIG. 37. — Action de l'acide gibbéréllique sur le bourgeonnement des tubercules de pomme de terre.

Après 30 jours, l'aspect des tubercules traités est très différent de celui des témoins (*pl. XII, 3*) : la gibbérelline a fortement augmenté le nombre et la longueur des bourgeons (*fig. 37 p. 146*).

Pour 10^{-7} il y a 54 et pour 10^{-3} 97 bourgeons.

Leur longueur croît lentement de 10^{-9} à 10^{-7} , atteint une valeur maximale pour 10^{-8} et diminue ensuite tout en restant même pour 10^{-3} bien supérieure à celle des témoins.

Le poids des pousses suit une évolution identique.

En présence d'acide gibbérellique les jeunes tiges sont grêles, la pigmentation anthocyanique est plus faible, les extrémités recourbées en crosse au début de la croissance sont vert pâle.

Nous avons également remarqué l'augmentation importante du nombre de bourgeons axillaires qui chez les témoins ne se développent que peu et rarement. Ce phénomène est surtout accusé (*fig. 38*), pour deux concentrations d'acide gibbérellique éloignées l'une de l'autre 10^{-8} et 10^{-4} .

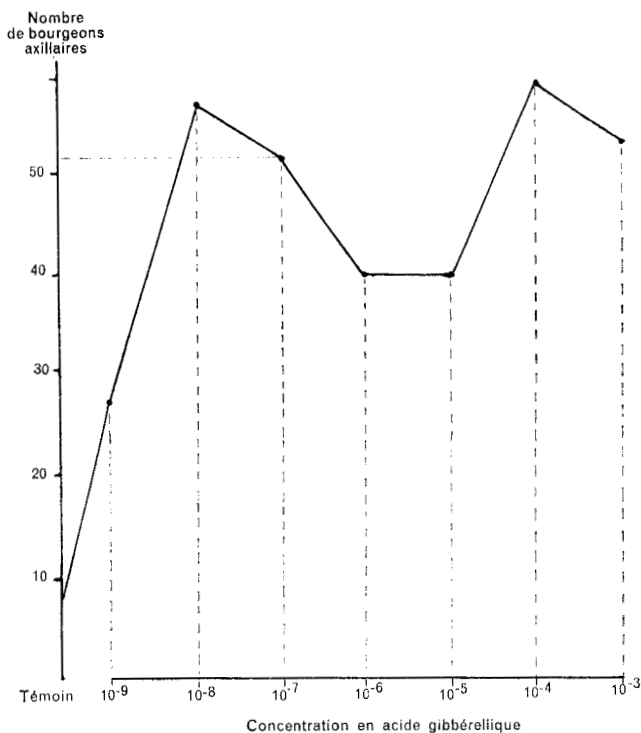


FIG. 38. — Influence de l'acide gibbérellique sur le développement des bourgeons axillaires des tubercules de pomme de terre.

Enfin, au point de vue histologique la gibbérelline intervient dans les phénomènes de lignification. GAUTHERET (1961) l'a observé dans des tissus de topinambour cultivés *in vitro*. Cela a été récemment signalé aussi pour les racines de haricot (ODHNOFF, 1963). Dans notre matériel tandis que chez les jeunes pousses témoins la lignification est limitée aux vaisseaux, elle atteint au contraire en présence d'acide gibbérellique toutes les cellules de plusieurs assises concentriques de l'anneau vasculaire.

En résumé, la gibbérelline exerce sur le bourgeonnement des tubercules de pomme de terre une action puissante.

Outre la propriété classique et fondamentale de la gibbérelline de favoriser l'élongation cellulaire, nos expériences montrent que cette substance : d'une part, joue un rôle dans l'organisation des corrélations hormonales s'opposant normalement au développement des bourgeons axillaires et, d'autre part, intervient dans la différenciation histologique.

Nous pouvons conclure sur plusieurs points.

Premièrement, par les dosages de gibbérelline que nous avons entrepris nous confirmons les travaux légèrement antérieurs de RAPPAPORT et SMITH (1962) sur l'existence de gibbérellines naturelles endogènes au sein des tubercules.

Deuxièmement, nos recherches établissent pour la première fois que la synthèse de gibbérelline peut être effectuée *in vitro* par les micro-organismes normalement présents dans les tubercules.

Troisièmement, suivant un processus déjà étudié par VAN HIELE (1961) et précisé par nous, la gibbérelline intervient puissamment dans les manifestations du bourgeonnement.

Il est donc tout à fait concevable, semble-t-il, de considérer que les gibbérellines endogènes, d'origine bactérienne notamment, pourraient dans notre matériel participer au métabolisme du bourgeonnement.

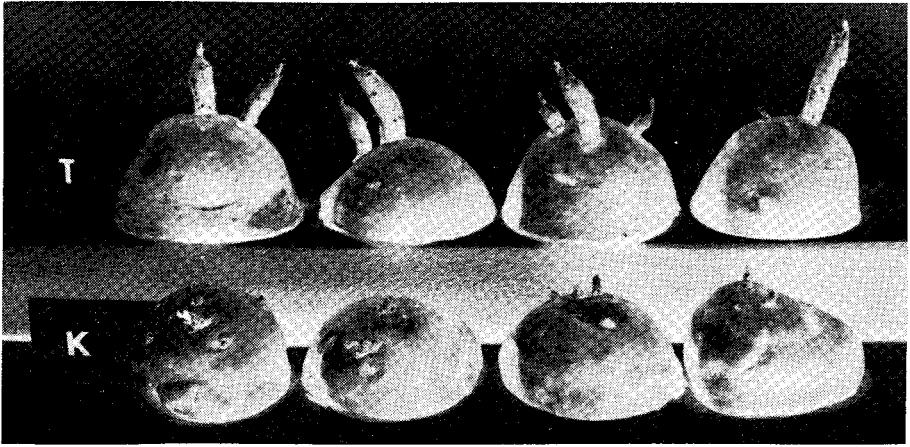
B) APPORT DE L'ACIDE GIBÉRELLIQUE A DIFFÉRENTS MOMENTS DE L'EXPÉRIENCE.

De l'essai précédent nous avons retenu comme la plus intéressante la concentration de 10^{-5} et l'avons exclusivement appliquée à ces nouveaux travaux.

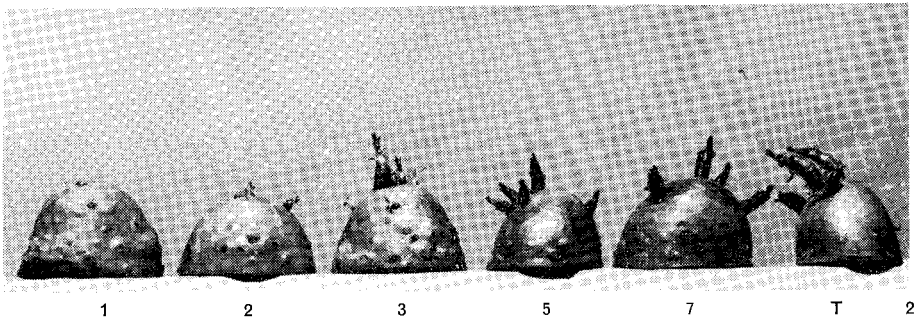
Dans une série de 10 cristallisoirs on apporte aux portions de tubercules, dès le premier jour, la solution de gibbérelline. Dans trois autres séries on ajoute, pour déclencher le processus de bourgeonnement, exclusivement de l'eau. Celle-ci est remplacée par la gibbérelline respectivement les 5^{me}, 10^{me} et 17^{me} jours de l'expérience. Des tubercules d'une série témoin se développent, d'un bout à l'autre des essais, dans l'eau. Les diverses grandeurs que nous étudions sont mesurées, en tous les cas, 30 jours après le début de l'expérience.

Agissant dès le départ, la gibbérelline provoque des effets que nous avons bien analysés au paragraphe précédent et que nous répétons ici pour comparaison.

Planche XII



Action de la kanamycine (K) (0,5 %) sur le bourgeonnement de tubercules de pomme de terre. T = témoin.



Apport de la kanamycine dans les sept premiers jours qui suivent la mise en expérience. T = témoin.



GIBBERELLINE 10^{-5} , 15 jours TÉMOIN 3
Action de la gibbérelline sur le bourgeonnement des tubercules.

Plus on retarde le moment de l'action du produit plus l'effet stimulateur de la gibbérelline s'atténue (*fig. 39,*).

Le nombre moyen de bourgeons par série est de 76 pour les témoins ; si l'apport de gibbérelline est effectué dès le premier jour ce nombre atteint 122. Ce chiffre baisse régulièrement à mesure que la gibbérelline est fournie plus tardivement : 117 (5^{me} jour), 98 (10^{me} jour) et 70 (17^{me} jour).

Le nombre de bourgeons axillaires de son côté, reste assez élevé (2 pour les témoins) quelles que soient les modalités d'action du produit.

Tout ceci indique que la gibbérelline pénètre bien dans les tissus et confirme la part que cette substance prend dans les corrélations hormonales, en particulier dès le déclenchement des processus qui contrôlent le bourgeonnement.

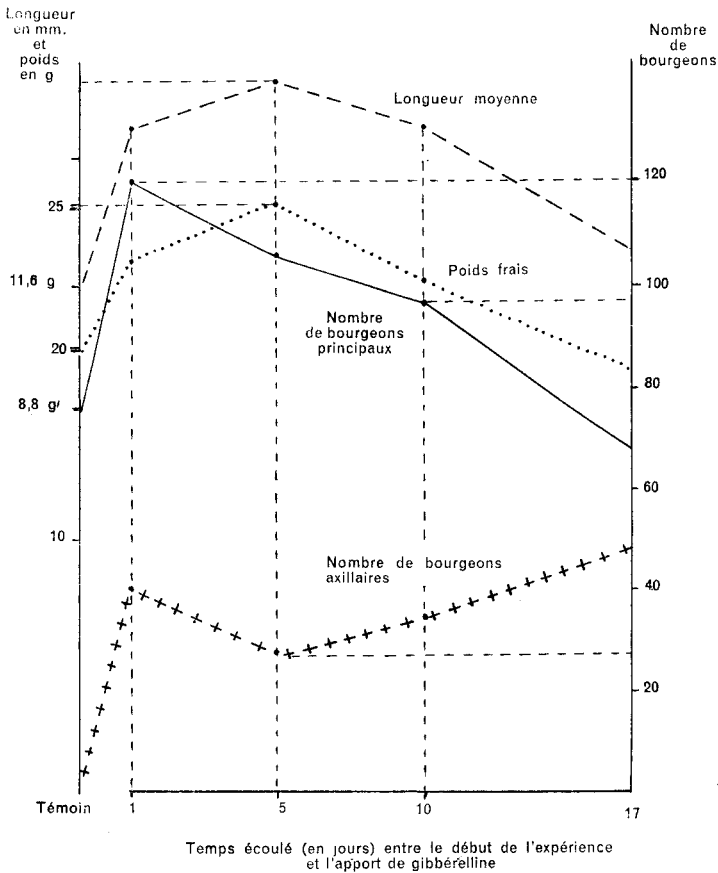


FIG. 39. — Influence d'un apport retardé de gibbérelline sur diverses caractéristiques du bourgeonnement des tubercules de pomme de terre.

3° Action combinée d'un antibiotique et de la gibbérelline.

Certains antibiotiques et l'acide gibbérellique se comportent, nous l'avons vu, vis-à-vis du bourgeonnement des tubercules de pomme de terre, de façon tout à fait opposée : les premiers l'inhibe, le second le favorise. Est-il possible, en faisant agir successivement ces deux produits, de rendre par la gibbérelline le pouvoir de bourgeonnement préalablement perdu par l'action plus ou moins prolongée d'un antibiotique ? Ces nouvelles séries d'expériences ont été entreprises pour répondre à cette question.

Nous avons retenu 2 antibiotiques : la kanamycine et le chloramphénicol, la gibbérelline est employée à la concentration de 10^{-5} .

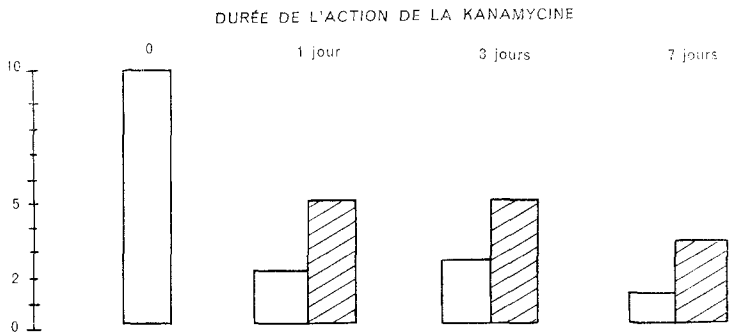


Fig. 40. — Nombre de tubercules ayant émis des bourgeons par séries.

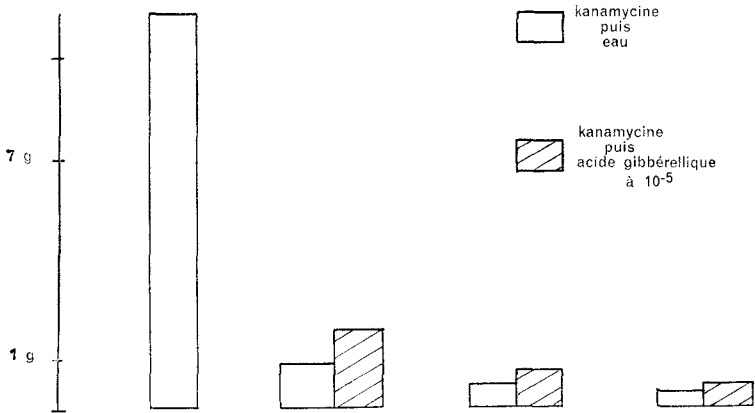


Fig. 41. — Poids frais des bourgeons émis par séries.

FIG. 40 et 41. — Actions successives de la kanamycine et de la gibbérelline sur le bourgeonnement des tubercules de pomme de terre.

A) KANAMYCINE.

L'essai comporte 7 séries de 10 cristallisoirs parmi lesquelles une ne reçoit que de l'eau (témoin), dans les 6 autres séries on place dès le premier jour une solution de kanamycine à 0,5 % (*pl. XIII, 2*).

Un jour plus tard la solution antibiotique est éliminée dans deux de ces 6 séries, elle est remplacée : d'une part, pour l'une de ces deux séries par 10 ml d'eau distillée et, d'autre part, par 10 ml. d'une solution d'acide gibbérellique à 10^{-5} . Il en va de même pour les autres séries après 3 et 7 jours d'action de l'antibiotique. Cette expérience permet donc de comparer la faculté de reprise du bourgeonnement en présence d'eau ou de gibbérelline et ceci après des durées variables d'inhibition par l'antibiotique.

L'inhibition exercée par la kanamycine s'accroît naturellement à mesure que son action se prolonge, mais, son remplacement par la gibbérelline conduit toujours à un nombre de tubercules ayant bourgeonné (*fig. 40, p. 150*) et à un poids de bourgeons (*fig. 41, p. 150*) dans chaque cas supérieurs aux chiffres correspondants obtenus en remplaçant l'antibiotique le même jour par de l'eau.

B) CHLORAMPHÉNICOL.

Il s'agit d'une expérience tout à fait parallèle à la précédente. Le chloramphénicol est utilisé à la concentration de 3.10^{-4} (*pl. XIII, 3*).

Comme avec la kanamycine le nombre de tubercules ayant bourgeonné (*fig. 42, p. 152*) et le nombre de bourgeons émis en remplaçant le chloramphénicol par la gibbérelline est supérieur (*fig. 43, p. 152*) à ceux que l'on obtient dans les mêmes conditions avec de l'eau distillée.

Si donc nous n'avons pu, par l'acide gibbérellique, rendre intégralement aux tubercules les possibilités de bourgeonnement qui étaient les leurs avant le traitement par la kanamycine ou le chloramphénicol, cela a néanmoins été possible partiellement. Après l'action des antibiotiques l'addition de gibbérelline provoque toujours un bourgeonnement plus important que dans les témoins.

Par conséquent, ces expériences montrent que la suppression du bourgeonnement après usage d'antibiotique pourrait découler d'une déficience dans la teneur en gibbérelline consécutive à la disparition des micro-organismes. Ces derniers pourraient être une source au moins partielle de gibbérelline ; un enrichissement extérieur en cette substance tend en effet à rétablir le bourgeonnement.

DURÉE DE L'ACTION DU CHLORAMPHÉNICOL

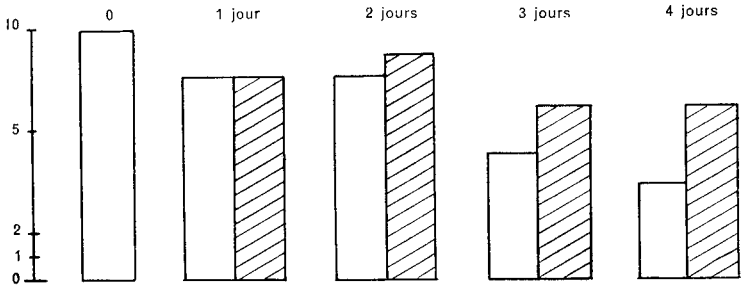


Fig. 42. — Nombre de tubercules ayant émis des bourgeons par séries.

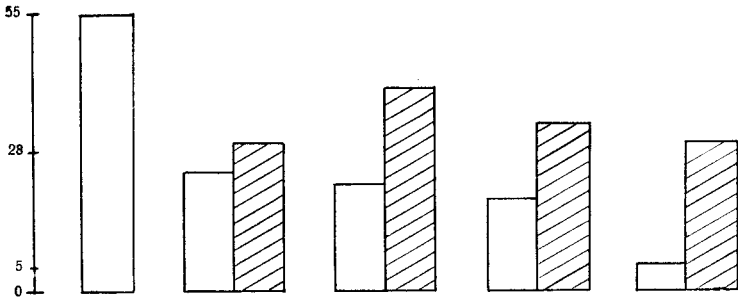
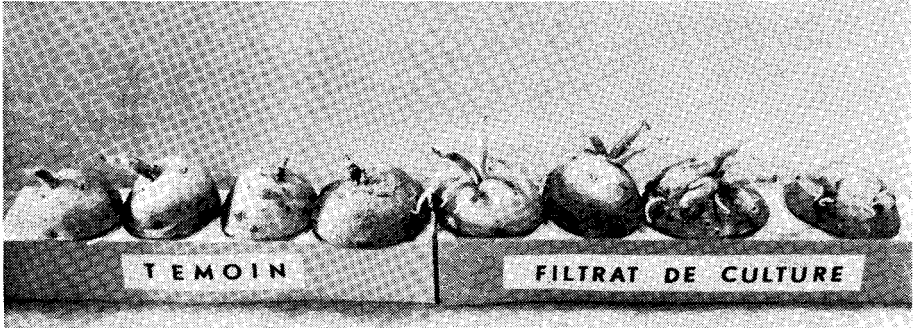


Fig. 43. — Nombre de bourgeons émis par séries.

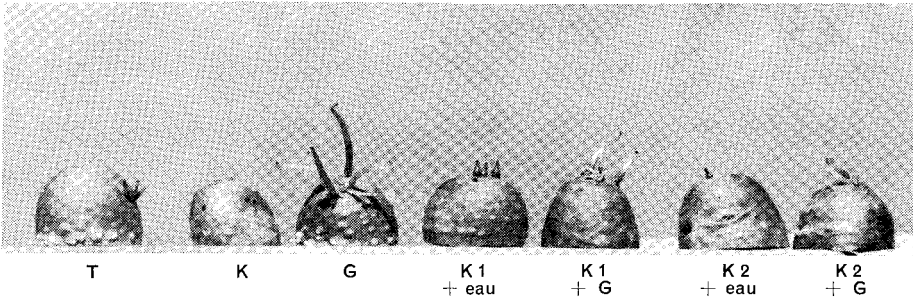
chloramphénicol puis eau chloramphénicol puis acide gibbérellique 10⁻⁵

FIG. 42 et 43. — Actions successives du chloramphénicol et de la gibbérelline sur le bourgeonnement des tubercules de pomme de terre.

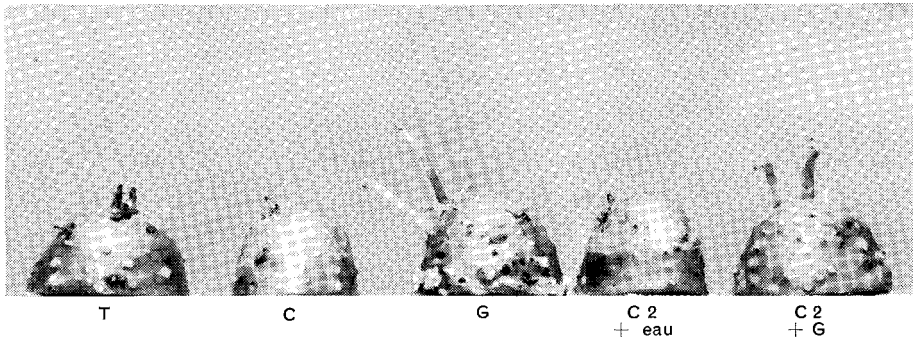
Planche XIII



1 : Action des filtrats de cultures bactériennes sur le bourgeonnement des tubercules de pomme de terre.



2 : Actions successives de la kanamycine (K) et de la gibbérelline (G).
 K = Action continue de la kanamycine.
 K₁ = La kanamycine a agi pendant un jour.
 K₂ = La kanamycine a agi pendant deux jours.
 T = Témoin.



3 : Actions successives du chloramphénicol (C) et de la gibbérelline (G).
 C = Action continue du chloramphénicol.
 C₂ = Le chloramphénicol a agi pendant deux jours.
 T = Témoin.

CHAPITRE VII

Discussion

Après avoir exposé les résultats de nos recherches nous allons essayer de critiquer la valeur de nos méthodes, de dégager les faits essentiels et, les ayant replacés dans le contexte scientifique, d'énoncer les réflexions générales qu'ils suggèrent.

I. — VALEUR DES MÉTHODES

Naturellement se pose la question de la valeur de nos méthodes, nous en avons quelque peu parlé au moment où nous les exposons. Dès le début de nos recherches, nous avons tenu à mener nos travaux à la fois sur les deux plans bactériologique et cytologique : non seulement nous avons isolé les micro-organismes des organes végétaux, mais nous les avons aussi observés au sein des tissus. Ces deux méthodes en se complétant mutuellement augmentent considérablement, pensons-nous, la valeur des résultats que nous avons obtenus, c'est pourquoi nous nous sommes astreint à développer nos travaux conjointement dans ces deux domaines.

1. Méthodes bactériologiques.

Les méthodes bactériologiques auxquelles nous avons eu recours sont classiques, elles sont utilisées dans tous les laboratoires de microbiologie, leur emploi journalier prouve assez leur efficacité, aussi serait-il bien vain et inutile, dans le cadre de notre travail, de les passer au crible de la critique.

Assurément la tentation est grande, et ce fut d'ailleurs notre première réaction, d'attribuer aux souillures extérieures le développement

des micro-organismes dans les milieux que nous ensemençons. Nous pensons que cette objection est très sérieuse, elle ruinerait si elle était vérifiée, tout notre travail ; c'est dire assez combien nous avons pris soin de nous tenir à l'abri des pollutions extérieures en assimilant méticuleusement toutes les techniques aseptiques du laboratoire de bactériologie. Nous pourrions trouver dans notre travail maintes preuves réfutant cette objection ; nous n'en retiendrons que deux.

a) Les conditions extérieures restant absolument identiques, si nous opérons deux séries de prélèvements dans un même lot de pomme de terre, la première, en octobre, la seconde en décembre, nous constatons que le nombre de bactéries est environ six fois plus important dans le second cas que dans le premier. Ces résultats ont été obtenus à plusieurs reprises et pendant trois années consécutives.

b) Si nous effectuons des explantats dans des tubercules ayant séjourné à 30° C, nous trouvons, malgré que les conditions de travail soient exactement les mêmes, un nombre de bactéries bien supérieur à celui que présentent des tubercules conservés à 15° C.

Il est impossible d'expliquer ces résultats autrement que par une variation du nombre de micro-organismes à l'intérieur même des tissus étudiés.

Certes, les risques de contamination étrangère sont réels, nous ne le dissimulons pas, mais ils ne sont pas supérieurs à ceux qui frappent tous travaux de ce genre.

Par conséquent, ces exemples, que nous pourrions multiplier (immersion dans une solution de sublimé), démontrent nettement que l'objection des pollutions extérieures ne peut pas mettre en cause la validité de nos résultats. Les variations de nombre que nous enregistrons, se produisent bien au sein même des organes étudiés.

Nous pouvons d'ailleurs à cet égard faire appel à l'expérience d'autres chercheurs. Les spécialistes de la culture de tissus qui réalisent des explantats dans des organes végétaux pour les transplanter *in vitro* en culture aseptique sur milieu gélosé, savent bien que le pourcentage de cultures polluées est très variable d'un végétal à l'autre et parfois même d'une saison à l'autre. Dans ce cas, on ne peut pas invoquer non plus les accidents de manipulation puisque les conditions extérieures restent pratiquement constantes. Nous pensons que ces variations sont dues à ce que les tissus eux-mêmes sont plus ou moins riches en micro-organismes susceptibles de se développer dans le milieu de culture.

2. Méthodes cytologiques.

Les méthodes cytologiques sont, elles aussi, classiques. Pour mettre en évidence les bactéries dans les cellules, nous avons eu recours à une technique de coloration connue depuis longtemps. Evidemment, dans ce domaine c'est l'observation qui constitue le point délicat. Un assez long entraînement a été nécessaire pour parvenir à reconnaître les micro-organismes au sein des cellules. Nous avons naturellement commencé

par examiner des tissus dans lesquels nous avons artificiellement provoqué la multiplication des bactéries. Pour éviter la confusion possible avec d'autres éléments cellulaires, nous n'avons tenu compte que des groupes de micro-organismes ; leur taille, leur forme, leur coloration, nous ont servi de points de repère. Nous n'avons attribué aucune valeur aux observations de corpuscules bactériiformes isolés.

Enfin, la partie physiologique de nos recherches, consacrée à la pomme de terre met en jeu, dans différents domaines (dénombrement, extraction et caractérisation de substances, usage d'antibiotiques) des techniques originales ou connues.

3. Méthodes de dénombrement. — Valeur statistique des résultats.

Pour les dénombrements, nous avons mis au point ce que nous avons appelé la « *technique des explantats en milieu liquide* », elle n'est dans notre esprit qu'une approximation destinée à examiner si le phénomène que l'on se propose d'étudier est digne d'intérêt. Les chiffres qu'elle permet d'obtenir sont finalement fonction de la proportion de cellules renfermant des bactéries dans l'organe considéré. En effet, quand l'emporte-pièce pénètre dans les tissus, il blesse, il « ouvre », disons-nous, un certain nombre de cellules. Qu'il y ait dans une de ces dernières, une seule ou un grand nombre de bactéries, nous enregistrons dans les deux cas, une seule « *réponse positive* ».

Par conséquent, le nombre de réponses positives obtenues par séries n'est pas en rapport direct avec le nombre de micro-organismes hébergés ; il donne une indication de valeur comparative sur la proportion de cellules hébergeant des micro-organismes.

Nous verrons ultérieurement quelles conséquences tirer de cette remarque lors de la discussion des résultats. Ces indications obtenues d'une façon simple et rapide ne sont, bien entendu, pas suffisantes ; elles nous ont néanmoins incité à poursuivre dans cette voie en nous tournant vers une technique classique, plus longue mais plus précise : la méthode de dénombrement en milieu solide. Dans ce cas on évalue effectivement le nombre de micro-organismes contenus dans un volume constant d'organe.

Quoi qu'il en soit, lorsque nous avons appliqué ces deux méthodes à la même étude, nous avons toujours trouvé des résultats concordants, qu'il s'agisse de l'immersion des tubercules dans le sublimé (*tableaux 44 et 45, p. 110*) ou de l'évolution naturelle des micro-organismes au sein des cellules (*fig. 8, p. 93*).

Cette correspondance est évidemment de nature à accroître, la valeur de nos résultats.

L'examen critique des dénombrements soulève encore une question importante : celle des variations individuelles. En effet, les résultats exprimés par des moyennes sont entachés d'erreurs plus ou moins importantes, provenant, d'une part, de la variabilité du matériel biologique et, d'autre part, de l'imperfection des techniques.

Dans le cas bien précis de l'étude de la population bactérienne des tubercules de pomme de terre, nous avons, à quinze jours d'intervalle,

appliqué la méthode de dénombrement en milieu solide à deux lots de tubercules d'âge physiologique aussi homogène que possible. Les résultats de ces deux séries de numérations sont portés aux *tableaux* 52 et 53.

A l'aide de ces données, et selon les méthodes de la statistique (1), nous avons calculé dans chaque cas :

- la moyenne arithmétique,
- la variance,
- l'écart type,
- l'erreur standard,
- l'intervalle de confiance.

Numéro des explantats	Nombre x de colonies	$x - \bar{x}$	$(x - \bar{x})^2$
1	9	- 9,5	90,25
2	30	+ 11,5	132,25
3	24	+ 5,5	30,25
4	26	+ 7,5	56,25
5	16	- 2,5	6,25
6	19	+ 0,5	0,25
7	14	- 4,5	20,25
8	19	+ 0,5	0,25
9	21	+ 2,5	6,25
10	14	- 4,5	20,25
11	12	- 6,5	42,25
$n = 11$	$\Sigma (x) = 204$		$\Sigma (x - \bar{x})^2 = 404,75$

Tableau 52. — Résultats des numérations de la série A. Population bactérienne de tubercules de pomme de terre. Calcul de la moyenne et des carrés des écarts à la moyenne.

Les résultats de la première série A (*tableau* 52), permettent de calculer :

— la moyenne arithmétique $\bar{x} = \frac{204}{11} = 18,5$

— la variance de la dispersion $V = \frac{\Sigma (x - \bar{x})^2}{n} = \frac{404,75}{11} \sim 36,8$

— l'écart type $\sigma = \sqrt{V} = \sqrt{36,8} \sim 6$

— l'erreur standard $s_m = \frac{\sigma}{\sqrt{n-1}} = \frac{6}{\sqrt{10}} = \frac{6}{3,17} \sim 1,9$

(1) Nous avons utilisé les ouvrages de : GAUTHERET (1959), LAMOTTE (1957), LIORZOU (1957).

L'effectif de l'échantillon étant nettement inférieur à 30 il faut utiliser la table de STUDENT. Pour $n-1 = 10$ et la probabilité de 95 % la table donne $t = 2,23$.

— L'intervalle de confiance de la moyenne, dans les conditions expérimentales, est donc de :

$$18,5 \pm s_m \times t$$

$$\text{soit } 18,5 \pm 1,9 \times 2,23$$

$$\text{c'est-à-dire de } 14,3 \text{ à } 22,7$$

Numéro des explantats	Nombre x de colonies	$x - \bar{x}$	$(x - \bar{x})^2$
1	31	— 12,3	151,29
2	35	— 8,3	68,89
3	38	— 5,3	28,09
4	45	+ 1,7	2,89
5	81	+ 37,7	1.421,29
6	11	— 32,3	1.043,29
7	23	— 20,3	412,09
8	39	— 4,3	18,49
9	41	— 2,3	5,29
10	77	+ 33,7	1.195,69
11	96	+ 52,7	2.777,29
12	45	+ 1,7	2,89
13	12	— 31,7	979,69
14	70	+ 26,7	712,89
15	26	— 17,3	299,29
16	23	— 20,3	412,09
$n = 16$	$\Sigma (x) = 693$		$(x - \bar{x})^2 = 9.471,44$

Tableau 53. — Résultats des numérations de la série B. Population bactérienne des tubercules de pomme de terre. Calcul de la moyenne et des carrés des écarts à la moyenne.

De la même façon que précédemment, nous avons pour la série B (tableau 53) :

— moyenne arithmétique $\bar{x} = \frac{693}{16} = 43,3$

— variance de la dispersion $V = \frac{9.471,4}{16} \sim 592$

— écart type $\sigma \sim 24,3$

— erreur standard $s_m = \frac{24,3}{\sqrt{15}} \sim 6,3$

Pour $n - 1 = 15$ et la probabilité de 95 % la table de STUDENT donne $t = 2,13$.

L'intervalle de confiance de la moyenne est donc de

$$43,3 \pm 6,3 \times 2,13$$

c'est-à-dire de 29,9 à 56,7

A partir de ces deux séries de mesures, nous pouvons apprécier la signification de la différence des deux moyennes.

Si σ_A est l'écart type de la série A comportant n_A mesures et σ_B est l'écart type de la série B comportant n_B mesures.

L'écart type de la différence des moyennes (σ_d) est donné par la formule :

$$\sigma_d = \sqrt{\frac{\sigma^2_A}{n_A} + \frac{\sigma^2_B}{n_B}}$$

soit

$$\sigma_d = \sqrt{\frac{36,8}{11} + \frac{592}{16}}$$

$$\sigma_d = \sqrt{40,3}$$

$$\sigma_d \sim 6,4$$

Il ne reste qu'à déterminer le degré de signification de la différence par la méthode de STUDENT comme dans le cas d'une seule moyenne.

Pour le degré de liberté correspondant à $n_A + n_B - 2 = 25$ et la probabilité de 95 % la table donne

$$t = 2,06$$

$$\text{donc } \sigma_d \times t = 6,4 \times 2,06 = 13,2$$

La valeur de ce produit est inférieure à la différence des deux moyennes.

$$43,3 - 18,5 = 24,8$$

$$13,2 < 24,8$$

On peut donc considérer la différence des deux moyennes comme significative à la probabilité considérée. Par conséquent la population bactérienne du lot A est significativement différente du lot B.

Cependant, dans la perspective où nous étions de chercher simplement à savoir s'il y avait des variations, il ne convenait pas d'exagérer l'importance de la précision des mesures. Il fallait en outre tenir raisonnablement compte du travail nécessaire pour chaque analyse et nous avons choisi de prendre 6 échantillons par série.

Dans ces conditions nous calculons l'intervalle de confiance de la moyenne obtenue pour 6 mesures.

Série A :

L'erreur standard nous l'avons vu, est :

$$\sigma_m \sim 1,9$$

Pour $n - 1 = 5$ à la table de STUDENT donne $t = 2,57$ l'intervalle de confiance de la moyenne est donc dans les conditions expérimentales,

$$18,5 \pm 1,9 \times 2,57$$

soit $18,5 \pm 4,9$

c'est-à-dire 13,6 à 23,4.

Série B :

$$\sigma_m \sim 6,3$$

intervalle de confiance

$$43,3 \pm 6,3 \times 2,57$$

$$43,3 \pm 16,2$$

$$27,1 \text{ à } 59,5$$

Dans la série A, la valeur supérieure de l'intervalle de confiance atteint 172 % de la valeur inférieure. Dans la série B, 219 % ; par conséquent nous ne pouvons tenir compte dans l'étude de la population bactérienne, que des variations dépassant légèrement le simple au double. Pour l'étude envisagée, nous pensons que cette précision est suffisante.

La régularité des courbes obtenues tend par ailleurs à confirmer cette opinion.

Pour atteindre une très bonne précision théorique il aurait fallu augmenter le nombre d'explantats dans une mesure telle que la quantité de travail devenait pratiquement irréalisable avec les moyens dont nous disposions.

4. Méthodes d'extraction et de dosage des substances de croissance.

Lorsqu'il s'est agi de caractériser des substances de croissance dans les tissus végétaux ou les milieux de culture bactériens, nous nous sommes adressé à des techniques récentes mises au point par des spécialistes (NIRSCH, PILET pour les auxines, PHINNEY pour les gibbérélines). Après avoir vérifié que les tests biologiques employés étaient bien spécifiques, nous avons, à partir de produits biologiques purs, extrait, isolé, séparé et dosé les différentes substances de croissance.

5. Étude du bourgeonnement des tubercules de pomme de terre.

Enfin, pour la dernière partie de notre travail, nous avons mis au point une technique permettant d'étudier l'influence des antibiotiques sur le déroulement du bourgeonnement des tubercules de pomme de terre. Cette méthode très simple pourrait permettre grâce à sa souplesse et ses possibilités de développement, de préciser aisément les relations entre les bactéries et les plantes supérieures.

II. — DISCUSSION DES RÉSULTATS

1. Notion de stérilité obligatoire.

Des tissus végétaux sains, c'est-à-dire exempts de maladie parasitaire connue, peuvent donc, nos travaux l'établissent clairement, héberger des bactéries. La cellule végétale par conséquent n'est pas nécessairement stérile.

La notion de stérilité obligatoire a été soutenue à plusieurs reprises, nous l'avons vu, à la fin du siècle dernier et il semble bien que souvent les milieux scientifiques soient étrangement restés sur cette idée dont l'origine découle pourtant seulement de principes théoriques supportés par des travaux hâtifs ou mal interprétés. Cette notion, ce dogme de la stérilité serait-on tenté de dire parfois, ne résiste pas à l'épreuve de l'expérimentation : c'est une idée qu'il faut qualifier d'erronée.

Le terme obligatoire nous semble déjà à lui seul d'un emploi peu justifié en biologie ne devrait-il pas être toujours accompagné par exemple de la restriction « dans l'état actuel des connaissances » ? Ce serait au moins prudent. Puisque cette obligation aboutit à une généralisation, il est en effet très présomptueux et peu scientifique, pensons-nous, de tirer d'une expérience forcément limitée une conclusion ayant finalement une valeur générale.

Si nous détruisons la conception d'une cellule végétale nécessairement et obligatoirement stérile, il ne s'ensuit pas naturellement que nous affirmions l'opinion exactement contraire, il s'en faut de beaucoup. Dire en effet que chaque cellule végétale héberge nécessairement et obligatoirement des micro-organismes serait tomber dans une autre erreur par une généralisation fautive parce qu'abusive elle aussi ; c'est un pas que nous ne franchirons point, nous tenons à le souligner très nettement. A aucun moment nous ne disons ni ne pensons que toutes les cellules végétales renferment des bactéries.

2. Interprétation pathologique.

Évidemment on peut, de prime abord et assez simplement, interpréter nos résultats en considérant les bactéries que nous avons isolées comme des agents pathogènes de maladies non encore décrites. Ainsi, à première vue la notion de la stérilité des cellules végétales pourrait être réhabilitée mais, à la réflexion, elle perd au contraire toute signification pour devenir une vérité purement formelle. Cela reviendrait, en effet, à dire : « toute cellule végétale non parasitée par des bactéries est stérile », formule bien inutile se bornant à enregistrer dans sa conclusion une vérité qui se trouve déjà dans l'introduction.

Cette façon de voir a cependant le mérite d'attirer l'attention sur un problème très important : celui de la définition de la maladie. Quand commence-t-elle ? Quand finit-elle ? « Tout homme sain est un malade qui s'ignore, dit-on ».

La maladie suppose nécessairement des symptômes, c'est-à-dire des modifications insolites d'ordre morphologique, cytologique ou physio-

logique par rapport à un autre état considéré comme normal ou sain. Un comportement pathologique se définit donc essentiellement par une comparaison.

Dans le matériel que nous avons étudié, après avoir éliminé les individus atteints de maladies connues, nous n'avons fait aucun tri, aucun classement. Les organes d'où nous avons pu isoler des bactéries ne se distinguaient en rien des autres ; ils étaient choisis au hasard. Dans ces conditions quel terme de comparaison pouvions-nous donc prendre pour déclarer ou non que ces bactéries devaient être considérées comme pathogènes ? Il eut fallu trouver et rassembler des organes exempts de micro-organismes, en faire l'étude morphologique, cytologique et physiologique pour examiner si dans l'un de ces trois plans on pouvait trouver des caractères distinctifs s'opposant à ceux des organes desquels nous avons pu isoler des bactéries. Cela nous semble bien difficile à réaliser puisque pour savoir si un organe renferme des micro-organismes, il faut le réduire, le détruire, ce qui naturellement empêche toute connaissance de son comportement ultérieur.

Mais prenons un exemple précis, celui de la pomme de terre que nous avons longuement étudié. Nous avons réalisé une très grande quantité d'explantats dans de très nombreux tubercules, malgré cela nous sommes incapables de donner des éléments distinctifs de quelque ordre que ce soit, permettant de classer les tubercules en deux catégories : les stériles et les non stériles. Ce manque de terme de comparaison ne permet pas d'apporter d'argument en faveur de l'hypothèse pathologique.

Certes, nous le reconnaissons volontiers, nous aurions pu accroître nos efforts en vue d'obtenir des tubercules stériles. On peut penser, en effet, d'une façon tout à fait théorique d'ailleurs, qu'en partant de semis aseptiques de graines et à partir d'une plantule paraissant intéressante on pourrait constituer un clone toujours élevé aseptiquement jusqu'à obtenir un certain nombre de tubercules. On confirmerait alors qu'un nombre suffisant de ces organes est bien aseptique.

Ou bien encore, après nous être assuré de la stérilité des méristèmes, cultiver *in vitro* des apex prélevés aseptiquement (méthode de MOREL) et obtenir ainsi des plantes stériles.

La réalisation sans doute très délicate des travaux que nous venons d'évoquer est très importante et serait très intéressante sans doute, mais, contraint de choisir devant un champ d'expérimentation si vaste, nous ne l'avons cependant pas inclus, dans notre premier programme de recherche.

Un autre argument semble-t-il va à l'encontre de l'interprétation pathologique : le pourcentage de tubercules donnant lieu à des ensemencements féconds est toujours très élevé, il atteint même toujours 100 % si les prélèvements sont effectués pendant la phase de multiplication des micro-organismes (décembre). Pourtant, qu'il s'agisse de l'une ou l'autre des méthodes de dénombrement nous n'étudions qu'un nombre très restreint de cellules par rapport à l'ensemble. Si les méthodes d'analyse étaient améliorées, nous ne trouverions très probablement pas de tubercules sans bactéries. Dans les conditions expérimentales décrites en tout cas la quasi totalité des tubercules ayant donné des ensemencements féconds, il semble difficile de considérer que la maladie atteigne un nombre aussi important d'organes.

On ne peut regarder comme accidentelle une situation qui : d'une part, est celle de la grande majorité des tubercules et, d'autre part, pendant la durée de nos recherches, a été retrouvée chaque année.

Si par ailleurs on examine la nature des micro-organismes isolés nous ne trouvons pas non plus en ce domaine beaucoup de raison de retenir l'interprétation pathologique. Les maladies bactériennes connues sont souvent le fait d'espèces caractéristiques n'ayant pas une ubiquité très grande ; au contraire, les bactéries que nous avons déterminées sont communes, elles ne sont pas spécifiques d'un habitat particulier, il n'y a parmi elles aucune espèce nouvelle.

Enfin, la notion de dommage est généralement associée à celle de la maladie : les tubercules que nous avons examinés appartenaient pour la plupart à la catégorie des plantes sélectionnées (classe A) ; en végétation, leurs semblables ont donné toute satisfaction.

Par conséquent, les différents plants que nous venons d'aborder : nombre d'individus atteints, spécificité, dommage, semblent permettre de ne pas retenir l'hypothèse de l'interprétation pathologique de l'existence de ces micro-organismes au sein des organes. Ce problème d'ailleurs ne pourra recevoir de solution valable qu'une fois trouvé un terme de comparaison, c'est-à-dire après avoir réussi à obtenir des individus complètement stériles.

3. Origine des bactéries.

Si l'on s'interroge sur l'origine des bactéries se trouvant au sein des organes, on peut *a priori* envisager deux possibilités :

- ou bien il y a pénétration des bactéries du sol au moment de la culture ;
- ou bien il peut se produire une transmission directe des micro-organismes d'une génération à l'autre.

Naturellement il peut s'agir aussi d'un phénomène mixte auquel participeraient les deux processus précédents.

Nous trouvons peu d'arguments en faveur de la première possibilité :

- il n'y a pas de zones à forte densité correspondant à une région de pénétration ;
- la partie périphérique du tubercule de pomme de terre n'est en général pas plus riche que la partie profonde ;
- au contraire, peu après la récolte, c'est-à-dire aussitôt après un contact prolongé avec le sol, c'est la partie profonde qui est la plus riche en micro-organismes ;
- l'examen de tubercules provenant de culture dans des sols très différents n'a pas montré de différences caractéristiques dans les espèces bactériennes isolées.

Mais au contraire nous avons pu trouver quelques indications en faveur de la seconde possibilité, par exemple :

- la présence de bactéries dans les bourgeons de pomme de terre et dans les très jeunes tubercules ;

— l'existence de micro-organismes dans les embryons de *Phaseolus*, dans les caryopses et les jeunes pousses de maïs et de blé développées aseptiquement.

Sans éliminer l'éventualité d'une transmission par le sol, nos travaux établissent donc que, par l'intermédiaire de l'embryon et de la jeune pousse, les micro-organismes peuvent passer d'une génération de la plante hôte à une autre.

Bien entendu cela revient à dire que l'œuf lui-même héberge des bactéries ; dans ce domaine aussi, naturellement, il faudra, étant donné l'importance du sujet, poursuivre les travaux. Ce que nous pouvons affirmer pour le moment c'est que ces jeunes pousses de maïs et de blé cultivées dans des conditions aseptiques renferment déjà des bactéries.

4. Situation des micro-organismes.

Les bactéries se trouvent donc en faible nombre dans le cytoplasme de certaines cellules, très rarement dans les espaces intercellulaires. Elles sont fréquemment groupées en colonies d'une dizaine d'individus.

Chez les différents végétaux qui ont fait l'objet d'observations cytologiques, les micro-organismes ont été observés dans des organes et tissus variés :

- le parenchyme : tubercule de pomme de terre et racine de betterave ;
- les vaisseaux conducteurs : racine tubérisée de carotte ;
- le coléoptile et la jeune feuille : jeune pousse de maïs et de blé.

5. Les réactions de défense de la plante supérieure.

Nous n'avons jamais remarqué de zone à densité importante de micro-organismes. Ceci indique évidemment que la cellule végétale se défend en limitant le nombre de bactéries ; un mécanisme physiologique s'oppose à leur prolifération au sein des cellules. Ce facteur n'est certainement pas trophique puisqu'il y a dans les cellules tous les éléments nutritifs dont les bactéries peuvent avoir besoin, il dépend plutôt de substances spécifiques de type antibiotique agissant à faible dose. Nous manquons d'indications à ce sujet mais l'inhibition pourrait être liée en particulier au déroulement normal de la respiration puisqu'en la bloquant (paraffinage, immersion, vide) on provoque la prolifération bactérienne. L'inhibition est également variable selon les diverses phases du métabolisme de l'hôte.

Les propriétés antibiotiques que nous venons d'évoquer sont d'ailleurs bien connues chez les végétaux ; elles ont été étudiées depuis 1943, notamment par OSBORN et LUCAS (1944), DUQUENOIS (1955).

VIRTANEN, HIETALA et WAHLROOS (1956), ont établi qu'il existe des substances antifongiques dans les plantules, les feuilles et les chaumes de Graminées (riz, maïs, blé). D'après WINTER et WILLECKE (1952), il existerait chez les *Poa*, *Phleum* et *Agropyrum* une substance inhibant la croissance du *Bacillus subtilis* : on pense qu'elle appartiendrait au groupe des dérivés de la 2-3 benzoxazolinone.

Un grand nombre de familles de Monocotylédones comprennent des plantes qui élaborent des substances antibiotiques (Joncacées, Iridacées, Cypéacées).

Chez les Dicotylédones, LAGRANGE (1954 et 1956) a montré qu'il devait, dans les feuilles de *Juglans regia*, à côté de la juglone, exister d'autres principes antibactériens et une substance légèrement stimulante pour le *Bacillus subtilis*. On a également signalé l'existence d'antibiotiques chez beaucoup d'autres plantes : DUQUENOIS (1958) après WAKSMAN (1948) a réalisé une mise à jour très détaillée sur ce sujet. Citons seulement après lui : *Humulus lupulus* (humulone et lupulone), *Ranunculus bulbosus*, *Lepidium sativum*, *Tropaeolum majus*, *Hypericum perforatum*, *Citrus Aurantium*, *Glaux maritima*, *Hieracium Pilosella*, *Inula britannica* et *Solidago Virga aurea*.

La production de substances antibiotiques par les végétaux n'est pas constante, elle est soumise à un certain nombre de facteurs internes et externes.

FERENCZY (1956 a) estime que dans les genres *Aristolochia* et *Consolida*, les graines produites par des pieds différents, appartenant à une même espèce, possèdent une activité très variable.

Il y a aussi une variation très nette du pouvoir bactériostatique en rapport avec les différents stades du développement de la plante. Le *Teucrium chamaedrys* étudié par RASHBA et Coll. (1954), n'est actif sur le *Staphylococcus aureus* que pendant la période de floraison. Chez *Juglans regia*, la substance bactéricide disparaît vers le 15 août. Selon FERENCZY (1956 b), dans les akènes de *Fraxinus excelsior* le phénomène de dormance et l'action antibactérienne sont vraisemblablement dus à une même substance.

Les végétaux supérieurs assurent leur protection par des substances antibiotiques surtout au moment de la fécondation et pendant la germination des graines. En effet, les nectaires de nombreuses plantes présentent un pouvoir bactéricide assez élevé (KARTASHOVA, 1957), CHAUVIN (1957) et ses collaborateurs LAVIE et LENORMAND (1957) ont étudié les substances antibiotiques du pollen (*Zea Mays*, *Castanea*, *Trifolium incarnatum*) et montré qu'elles étaient actives *in vitro* sur le *Bacillus subtilis*.

Chez la graine, les principes actifs sont localisés dans les téguments ; ils peuvent par conséquent jouer un rôle de protection au moment de la germination. Dans les organes de réserve, racines tubérisées et bulbes, la présence de substances phénoliques diverses est de nature à empêcher la pénétration des micro-organismes (acide protocatéchique, de l'épiderme de l'oignon) acide chlorogénique du périoderme de la pomme de terre (JOHNSON et SCHAAL SERMER, 1952).

Signalons enfin, qu'une plante peut contenir dans ses différents organes des antibiotiques différents n'agissant pas sur les mêmes micro-organismes.

Tous ces résultats montrent l'importance, la variabilité et la grande fréquence de la production de substances antibiotiques par les végétaux ; ils permettent de penser que ces produits peuvent également exercer leur pouvoir dans les cellules, vis-à-vis des bactéries hébergées, dont nous nous sommes préoccupé depuis le début de ce travail. Naturellement

à leur égard aussi le pouvoir antibiotique des cellules est susceptible de varier avec les différentes étapes physiologiques du développement de la plante.

Dans ce domaine il faut signaler les très intéressants travaux réalisés en Espagne par VINCENTE JORDANA (1954 à 1960), précisément sur le même matériel que le nôtre : les tubercules de pomme de terre. L'auteur, après avoir introduit dans des tubercules des bactéries phytopathogènes (*Erwinia carotovora* var. *typicum*, *aroidæ* et *atroseptica* : *Bacillus polymyxa*) constate que la progression de l'infection varie considérablement selon le stade physiologique où sont parvenus les tubercules.

La quantité de tissus atteints par l'attaque bactérienne est très importante en l'absence de bourgeons bien développés sur les organes ; au contraire, en leur présence les dégradations sont d'autant plus faibles que la germination était plus avancée. Le pouvoir antibiotique augmente donc à mesure que la germination évolue. Pour confirmer et préciser ces résultats, des recherches sont en cours dans notre laboratoire.

Cependant une remarque que nous avons pu faire maintes fois va d'ores et déjà dans le sens des travaux de VINCENTE JORDANA. Dans les expériences qui consistent à poser dans l'eau d'un petit cristalliseur la moitié apicale de tubercules de pomme de terre on note que, si les fragments de tubercules ne sont pas germés, des pollutions bactériennes s'installent dans certains récipients ; cela ne se produit jamais si l'on met dans l'eau des parties pourvues de bourgeons déjà développés. En d'autres termes si l'on met germer des fragments de tubercules, en les plongeant dans l'eau, les pollutions extérieures ne peuvent s'installer qu'au début de l'expérience ; dès que les bourgeons ont poussé aucune pollution ne survient. On peut donc dire qu'au fur et à mesure du déroulement de la germination des tubercules le pouvoir antibiotique prend naissance puis s'accroît.

6. Les variations du nombre de cellules hôtes.

Nous savons qu'à certaines périodes le peuplement bactérien des tubercules de pomme de terre s'accroît assez rapidement et notablement. Si l'on examine de plus près la signification des résultats obtenus en ce domaine par chacune des deux méthodes, on s'aperçoit que l'on peut en tirer d'autres enseignements.

Dans la technique des explantats en milieu liquide le nombre de *tubes positifs* trouvés par série n'est pas directement en relation avec le nombre de micro-organismes hébergés. En effet, qu'il y ait seulement une bactérie dans l'une des cellules blessées ou un grand nombre dans plusieurs cellules, nous n'enregistrons toujours qu'une seule réponse positive. Il en résulte que le nombre de ces réponses évalué par rapport à une série d'expériences représente donc plutôt la probabilité pour que l'outil rencontre et « ouvre » une cellule hébergeant des bactéries.

Par conséquent, par cette méthode nous mesurons en quelque sorte les proportions relatives de cellules hôtes au sein de l'organe considéré.

Ces proportions varient, et, en particulier, le nombre de cellules hôtes augmente fortement pendant certaines périodes. Ceci pourrait s'expliquer de deux façons différentes :

— soit qu'il existe pour les micro-organismes une possibilité de passage d'une cellule à l'autre à travers la paroi cellulaire (1) ;

— soit que les micro-organismes se trouvant dans une cellule demeurent à certains moments incapables de proliférer en raison de l'action d'un système inhibiteur dont la disparition rendrait au contraire possible le développement des bactéries dans la cellule considérée.

Les observations cytologiques ont révélé aussi que le nombre de cellules hôtes était susceptible de s'accroître, notamment au cours de certains traitements artificiels. Il y a en même temps, nous l'avons vu, augmentation de l'importance des colonies comme en témoignent d'ailleurs également les résultats des dénombrements en milieu solide.

En bref, sans qu'il soit possible, dans l'état actuel de nos recherches, d'établir par quel mécanisme, nous montrons néanmoins que le nombre de cellules hôtes varie avec le temps ou les circonstances. Il faut bien d'une certaine façon qu'au sein des tubercules de pomme de terre, les micro-organismes se transmettent ou passent d'une cellule à une autre pour que nous puissions les isoler, à partir d'explantats prélevés au hasard dans l'organe, ce qui traduit somme toute l'existence d'un phénomène assez diffus.

7. Les variations du peuplement bactérien.

L'augmentation du peuplement bactérien corrélative à l'élévation du nombre de cellules hôtes, se produit, pour notre matériel, essentiellement à un moment bien déterminé de sa physiologie. Cela est particulièrement net et repose, nous l'avons vu, sur de solides bases expérimentales.

Que savons-nous de ce phénomène ?

D'abord qu'il se manifeste, dans les conditions de conservation que nous avons appelées naturelles (séjour à 15° C), pendant la période de préparation du bourgeonnement, juste avant l'émission extérieure et visible des germes. L'augmentation du peuplement bactérien n'accompagne donc pas la sortie et le développement des bourgeons, elle les précède. Par exemple (*fig. 8, p. 93*) dans l'une des expériences le peuplement bactérien atteint son maximum le 15 décembre alors que l'on commence seulement à cette époque à remarquer la sortie des bourgeons. En termes d'interprétation peut-être pourrions-nous, ultérieurement, considérer que ces deux phénomènes consécutifs sont reliés par des relations de cause à effet.

(1) A titre d'hypothèse on peut imaginer que les bactéries pourraient sécréter un ferment qui, très localement et temporairement, en affaiblissant la membrane cellulaire, permettrait le franchissement sans causer de rupture permanente. Ce cas est bien connu chez certaines Ustilaginales : les hyphes peuvent pénétrer à travers la paroi cellulaire mais après leur passage il n'y reste plus d'ouverture apparente.

Nous savons aussi que même si l'on empêche — ou plus exactement — retarde notablement l'émission, des bourgeons, soit par l'action du froid continu, soit par celle d'un inhibiteur chimique, l'augmentation du nombre de bactéries se produit néanmoins, quoique plus lentement. Il s'agit donc bien d'un mécanisme normal lié de façon impérative à l'évolution interne, physiologique du métabolisme de l'organe.

Nous avons encore établi que les produits devant la dormance des tubercules, c'est-à-dire susceptibles de supprimer les obstacles à l'émission des bourgeons provoquent également l'augmentation du nombre des bactéries. Cette remarque va bien dans le même sens que les deux précédentes.

Nous savons enfin, mais nous y reviendrons encore ultérieurement, que cette relative poussée bactérienne ne dure pas : une nette régression la suit et correspond à une période de développement actif des bourgeons.

La cytologie permet de compléter quelque peu ces résultats. Elle les confirme d'abord, car nous avons observé, près des éléments conducteurs aboutissant aux bourgeons naissants, des colonies trois ou quatre fois plus importantes que dans les tubercules au repos : elle apporte aussi quelques précisions. En effet, d'une part, les micro-organismes sont plus nombreux dans les cellules où l'amidon est très dégradé ; ceci indique sans doute que la concentration glucidique, comme on pouvait s'y attendre, a une grande influence sur l'évolution du métabolisme bactérien et permet de donner une explication aux variations numériques enregistrées quelque temps avant l'émission des bourgeons, c'est-à-dire à un moment où l'hydrolyse de l'amidon est importante.

Lorsque les bourgeons ont commencé à se développer on note, d'autre part, que les bactéries, assez fréquentes dans et autour des vaisseaux, se retrouvent dans les jeunes pousses ; à partir de ce moment elles sont moins nombreuses dans le tubercule.

8. Les bactéries interviennent-elles dans le bourgeonnement des tubercules ?

Des relations existent donc, les résultats regroupés ci-dessus le montrent clairement, entre le métabolisme des bactéries et celui des tubercules, en particulier au moment où ces derniers entrent dans la période de bourgeonnement. Cette phase importante du métabolisme de l'organe est la résultante d'un ensemble complexe de facteurs au nombre desquels on peut citer entre autres : la richesse en sucres libres, la teneur enzymatique, la concentration auxinique, les phénomènes respiratoires ; chacun d'entre eux subissant évidemment les influences réciproques des autres. Nous avons montré que les micro-organismes présents au sein des cellules ne restent pas insensibles à toutes ses modifications.

Cependant, en allant plus loin, certaines expériences permettraient même de penser que les bactéries pourraient être l'un de ces nombreux facteurs intervenant dans le déclenchement du bourgeonnement. En effet, en détruisant les bactéries au sein des organes par un antibiotique, la kanamycine, dont on a bien entendu vérifié la pénétration dans les tissus et l'action bactériostatique dans les organes, la germination des

tubercules peut, nous l'avons vu, être complètement entravée. Pour interpréter ce résultat on ne peut faire intervenir la toxicité directe de l'antibiotique sur le métabolisme de la plante supérieure puisque dans des conditions que nous avons précisées, le bourgeonnement peut se dérouler normalement en présence de ce produit. A cet égard encore, l'emploi de la néomycine à deux pH différents prouve que la suppression du bourgeonnement est bien en rapport avec l'activité bactériostatique des antibiotiques utilisés.

Les bactéries doivent donc, dans le cadre de nos travaux, avoir leur place dans l'ensemble complexe des déterminants de la germination. Poussant davantage l'analyse des résultats, on constate que l'antibiotique ne supprime la germination des tubercules que s'il agit très tôt, dès que l'on a mis les organes en conditions externes de bourgeonnement ; si on laisse s'engager, même très peu, ce processus avant d'ajouter le produit il n'a plus aucun effet.

C'est par conséquent dans une phase de courte durée et très précoce, précédant en tout cas l'émission des bourgeons, que se placerait l'intervention cependant nécessaire, des bactéries dans le métabolisme de la pomme de terre.

Quels peuvent être la nature et le processus des relations entre les bactéries et les plantes se nouant ainsi, notons-le, à un moment où le peuplement bactérien est important ? Il ne peut s'agir, sans doute, que d'un facteur chimique produit par les micro-organismes pendant leur phase de multiplication active, agissant à très faible dose, et, maillon d'une chaîne de mécanismes complexes, capable d'induire des modifications du métabolisme du tubercule.

Les possibilités de synthèse des bactéries sont très étendues aussi était-il bien difficile de s'engager dans la recherche d'un métabolite spécifique dont cependant nous n'éliminons pas *a priori* l'existence. Nous avons préféré limiter notre étude à la synthèse éventuelle par les micro-organismes hébergés de substances de croissance connues pour leur intervention, même à très faible dose, dans le métabolisme des végétaux et notamment au moment du bourgeonnement.

Dans cet ordre d'idées, nous avons effectivement montré que les bactéries isolées des végétaux pouvaient produire *in vitro* de l'acide indole-acétique et des substances de type gibbérelline.

Les constituants du milieu de culture (tryptophane, pyruvate, glucose) ne sont pas à ce point éloignés des substances naturelles du métabolisme cellulaire pour que l'on ne puisse envisager que ces synthèses se produisent également *in vivo*. Ainsi s'expliquerait l'intervention des micro-organismes dans la physiologie de l'hôte. De fait il existe, nous l'avons vu, au sein des organes à certaines périodes, une assez bonne correspondance entre le niveau du peuplement bactérien et la teneur en acide indole-acétique ou en substances de type gibbérelline : les concentrations en substances de croissance s'élevant lorsque les micro-organismes se multiplient (*fig. 22 à 27*).

Cependant nos résultats, naturellement fragmentaires, sont sur ce point d'une interprétation délicate et en particulier pour deux raisons :

— d'autres sources de substances de croissance résultant de l'activité propre des cellules végétales risquent d'une part, de troubler les résultats des dosages ;

— le peuplement bactérien, bien qu'en nette augmentation, n'atteint jamais, d'autre part, un niveau très important, il n'est pas comparable évidemment à celui qui se développe *in vitro* et il ne permet pas à lui seul d'expliquer les variations relativement importantes notées dans la concentration en substances de croissance.

Les bactéries interviennent pourtant très nettement dans la vie de l'hôte puisque l'apport de substances qu'elles peuvent synthétiser, notamment la gibbérelline, permet de rétablir, au moins partiellement, la faculté de bourgeonnement préalablement inhibée par un antibiotique.

9. Proposition d'un schéma tenant compte de nos résultats.

Si l'on veut tenir compte de l'ensemble des résultats expérimentaux et de tous les éléments de la discussion que nous venons d'entreprendre, dans le cadre du paragraphe consacré aux substances de croissance, on aboutit à une conception que nous allons tenter maintenant de schématiser.

Il arrive un moment, dans le métabolisme du tubercule, où sous l'influence de facteurs ou de conditions, qu'il reste à préciser, mais parmi lesquels pourrait entrer la teneur en glucides libres des tissus, les bactéries se multiplient.

Cette intense activité bactérienne a pour conséquence la production d'acide indole-acétique et de substances du groupe des gibbérellines qui, s'ajoutant aux quantités déjà présentes dans les cellules, permet d'atteindre un niveau de concentration suffisant pour déclencher l'organisation et le fonctionnement des centres méristématiques capables de synthétiser à leur tour ces hormones par une autre voie.

Cette façon de voir (*fig. 44*) permet de rendre compte de l'existence d'une phase précoce du métabolisme sensible à l'antibiotique et d'une phase plus tardive insensible. Le passage du niveau 1 au niveau 2 (*fig. 44*) dépendrait donc essentiellement et nécessairement du métabolisme bactérien.

Les micro-organismes eux-mêmes, comme nous le montrons par nos analyses, secrèteraient directement des produits de même nature que ceux qui existaient déjà au sein des cellules et s'y ajoutant.

On peut cependant envisager également soit un apport de précurseurs hormonaux, soit l'intervention d'un métabolite particulier exaltant la synthèse des substances de croissance par les cellules.

Le schéma que nous venons d'établir s'accorde parfaitement et prolonge les résultats de KULESCHA (1952). Cet auteur a constaté que le pouvoir de prolifération des tissus de tubercule de topinambour cultivés *in vitro*, qui était assez faible au moment de la maturité, devenait important au printemps. Corrélativement la teneur des tissus en auxine augmente et les tubercules commencent à bourgeonner. Ainsi est-on amené à penser que l'auxine provient des bourgeons. Pourtant la reprise

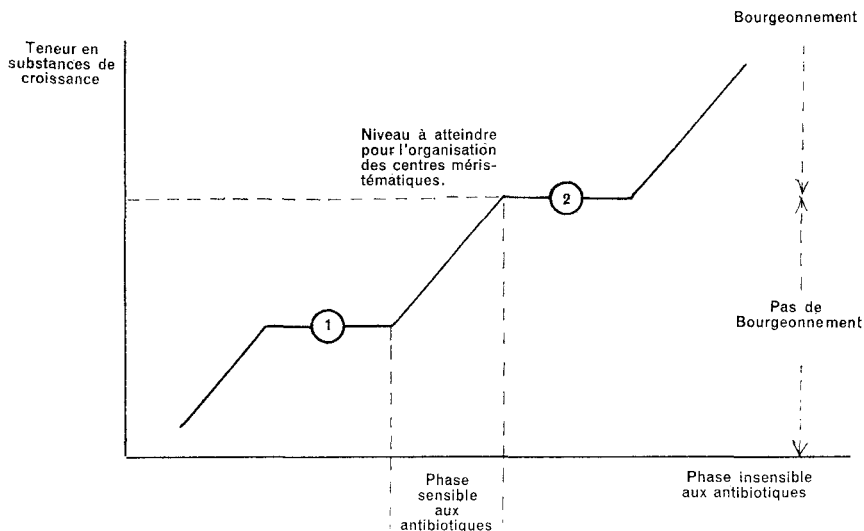


Fig. 44. — Transcription schématique de l'intervention des bactéries dans les processus du bourgeoisement.

de la prolifération peut intervenir à la même époque pour des fragments de tubercules qui n'ont eu aucun rapport avec les bourgeois. Ceci démontre donc que le parenchyme élabore lui aussi de l'auxine.

L'augmentation de la teneur en acide indole-acétique des tubercules, note encore KULESCHA, précède le développement des bourgeois.

L'analogie avec nos résultats est très grande.

De nos travaux il ressort en effet, qu'à la quantité d'auxine présente dans les cellules parenchymateuses vient s'ajouter la sécrétion des bactéries hébergées qui prolifèrent abondamment dans le parenchyme précisément, là encore, juste avant le développement des bourgeois. Cette étroite similitude nous renforce bien entendu dans l'opinion qu'il existe un rapport bactéries-auxine.

Par différentes considérations sur la prolifération et l'élongation cellulaire le même auteur en arrive à proposer l'existence de deux catégories d'auxine. Cela pourrait effectivement se produire puisque pour nous, cette substance pourrait avoir deux origines différentes (les micro-organismes et les cellules) qui seraient susceptibles de posséder des activités légèrement dissemblables.

MARIAT (1951), élève de MAGROU, de son côté, établit au cours de ses recherches sur la physiologie des embryons d'Orchidées, que le champignon symbiotique agit en saccharifiant l'amidon contenu dans

les cellules de l'embryon et, à la suite de l'accroissement de la pression osmotique permet la germination de la graine. L'endophyte fournit en outre aux jeunes embryons le supplément de vitamines qu'il synthétise en partie. Il s'agit là encore de résultats et d'interprétations présentant beaucoup d'analogie avec les nôtres.

Quel que soit le mécanisme mis en jeu, l'augmentation même faible de la concentration en substances de croissance d'une cellule modifie considérablement son métabolisme. A cet égard, selon des travaux très récents, l'acide gibbérellique contrôlerait la synthèse de l' α -amylase et réglerait par conséquent le processus de germination. PALEG (1961), MACLEOD et MILLARD (1962), YOMO et INUMA (1962), BRIGGS (1963) et surtout VARNER (1964), montrent que l'acide gibbérellique, par un mécanisme dans lequel entre une protéine non identifiée, provoque la formation d' α -amylase dans les couches à aleurone du caryopse d'*Hordeum vulgare*.

S'il en allait de même dans les tubercules de pomme de terre, et nous nous proposons d'étudier cela prochainement, il y aurait là une explication assez séduisante de l'intervention des bactéries dans la germination des tubercules.

La *fig.* 45 présente un schéma simplifié du mécanisme possible. Les bactéries se comporteraient comme une source de gibbérellines qui, s'ajoutant à celle déjà existante dans les cellules et grâce à différents autres facteurs, déterminerait la formation d' α -amylase : celle-ci dégraderait les glucides complexes et libérerait des sucres simples utilisés à la fois par la plante et les bactéries dont le nombre peut ainsi rapidement augmenter.

Pour l'acide indole-acétique on peut envisager un processus identique puisque cette substance, selon de nombreux auteurs, est susceptible d'intervenir aussi dans l'amylolyse.

Par exemple, travaillant sur la tomate, BAUSOR (1942), démontre que la concentration de 0,02 % d'acide indole-acétique est une limite au-dessus de laquelle il y a accélération de l'hydrolyse de l'amidon et retard en dessous.

PILET et MARGOT (1953) constatent que l'amidon est moins abondant dans les racines âgées de *Lens* et attribuent ce phénomène à l'augmentation progressive des auxines endogènes avec l'âge des racines.

PILET et NURGLER (1953) confirment ce point de vue et provoquent la dégradation de l'amidon du même matériel en le traitant par de l'acide indo-acétique. Dans les tissus radiculaires du *Rumex*, BRAKKE et NICKELL (1952) établissent l'activation de l'amylase par l'acide indole-acétique.

In vitro, l'hydrolyse de l'amidon n'a pu être réalisée en présence d'acide indole-acétique ; pour y parvenir il faut ajouter des extraits de tissus vivants de *Lens* (PILET et TURIAN, 1953) ou d'*Avena* (ANKER, 1953).

Bien entendu, les deux substances dont nous venons d'envisager l'intervention n'agissent pas uniquement en tant que facteurs de formation d'amylase. La gamme de leurs possibilités physiologiques est très

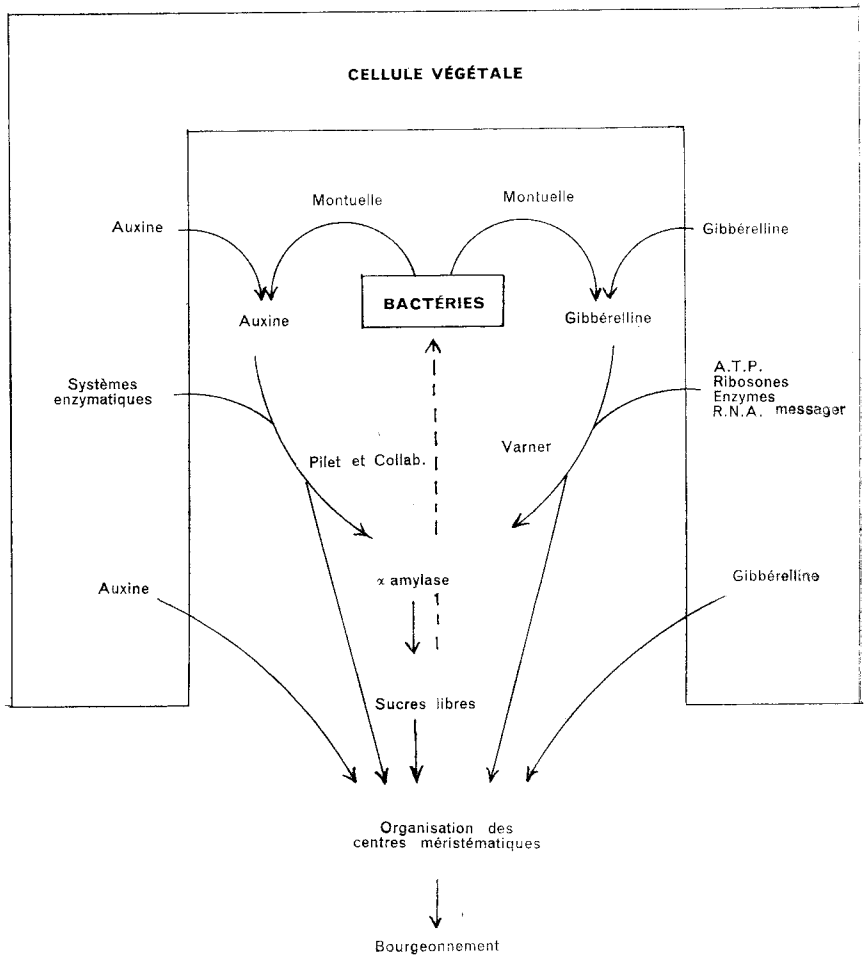


FIG. 45. — Essai d'interprétation de l'intervention des bactéries dans les processus aboutissant au déclenchement du bourgeoisement des tubercules de pomme de terre.

étendue et ce serait sortir du cadre de nos préoccupations que de les exposer longuement. Le lecteur intéressé pourra se reporter aux ouvrages ou articles spécialisés (1).

Limitons-nous donc à quelques indications rapides.

(1) Pour les auxines : THIMMAN (1956-1960), AUDUS (1959), PILET (1961). Pour les gibbérellines : STOWWE et YAKAHI (1957), CHOUARD (1958), BRIAN (1959), MONTUELLE (1962).

La présence de gibbérellines endogènes dans les tubercules de pomme de terre ne fait aucun doute : elle a été mise en évidence récemment par de nombreux auteurs : OKAZAWA (1959), SMITH et RAPPAPORT (1960), HAYASHI, BLUMENTHAL-GOLDSCHMIDT et RAPPAPORT (1962) et par nous enfin, ici même (p. 130).

RAPPAPORT et SMITH (1962) ont étudié les variations quantitatives des gibbérellines endogènes dans les tubercules de la variété « red Pontiac » ; la teneur reste faible pendant toute la période de dormance et s'accroît considérablement ($\times 30$) au moment de la germination.

Par un apport extérieur d'acide gibbérellique on peut : activer la germination de semences de *Lactuca* (LONA, 1956) ou d'*Evonymus europaeus* (BULARD et MONIN, 1960), raccourcir chez la pomme de terre la période de dormance des tubercules (RAPPAPORT, LIPPERT et TIMM, 1957 ; LAGARDE, 1959 ; TIMM, RAPPAPORT et Coll., 1960 a, b et 1962), augmenter le nombre de bourgeons qui s'y développent (VAN HIELLE, 1961), intervenir dans les phénomènes de tubérisation (TIZIO, 1964) (1).

Nos travaux (p. 145) précisent, d'autre part, l'influence très nette de l'acide gibbérellique sur les tubercules de pomme de terre. Nous avons noté l'augmentation importante du nombre des bourgeons, la réduction du diamètre des pousses, l'accroissement important de leur longueur, le développement des bourgeons axillaires, la lignification importante de l'anneau vasculaire.

Même si les modalités de l'action des gibbérellines sont encore assez mal connues, on mesurera mieux à l'aide des exemples précédents la place que prennent ces substances dans le métabolisme de l'organe et par conséquent l'importance qu'il faut accorder à tout ce qui peut en modifier la teneur.

Il n'y a non plus aucun doute quant à la présence d'acide indole-acétique dans les tubercules de pomme de terre parfaitement établie par de nombreux auteurs : PAVILLARD (1949), BLOMMAERT (1954), HEMBERG (1954), VARGA et FERENCZY (1957), SZALAI (1959), MONTUELLE et CORNETTE (1964).

Quelle que soit la théorie générale adoptée pour expliquer le déclenchement du bourgeonnement, mécanisme purement auxinique ou intervention d'un système inhibiteur, la concentration en auxine est, dans les deux cas, un facteur déterminant. Par conséquent, tout ce qui tend à modifier cette valeur, le nombre ou la vitalité des micro-organismes, par exemple, peut avoir des retentissements importants sur la vie de l'organe. Rappelons simplement, à titre d'exemple, le rôle de l'auxine dans l'élongation cellulaire, la régulation des synthèses protidiques et des réactions enzymatiques, les échanges respiratoires, le métabolisme du phosphore, etc...

Puisque l'acide gibbérellique et l'acide indole-acétique se trouvent l'un et l'autre dans notre matériel, il faudrait naturellement aussi tenir compte du synergisme possible entre ces deux substances. Des travaux

(1) MADEC (1963) vient de publier une mise au point importante sur la physiologie de la pomme de terre.

de BRIAN et HEMMING (1957), GALSTON (1958), KATO (1958) et GALSTON et WARBURG (1959), il découle que le premier acide provoque dans les tissus traités, un accroissement de la teneur du second. Cette hyperauxinie, précisent les auteurs, pourrait être due soit à l'activation de la transformation des précurseurs, soit à l'inhibition de la destruction enzymatique de l'auxine.

Réalisant des observations histologiques dans des tissus de topinambour cultivés *in vitro*, GAUTHERET (1961 et 1964) précise qu'il obtient une production exubérante de formations criblo-vasculaires dans des cultures effectuées en présence d'auxine et soumises, soit à une température relativement élevée, soit à un traitement par de l'acide gibbérellique. Il se demande donc si le traitement thermique n'aurait pas pour effet de provoquer l'élaboration d'une substance de ce type par les tissus.

Ce rappel des propriétés des substances de croissance, existant dans les tubercules et susceptibles d'être synthétisées par les bactéries, n'a pas du tout pour but de proposer une explication d'ensemble des mécanismes physiologiques liés au bourgeonnement : c'est l'affaire de spécialistes. Cette entreprise serait pour l'instant d'ailleurs présomptueuse et prématurée ; nous voulons simplement, dans le cadre de cette discussion, attirer l'attention sur l'importance qu'il faut accorder à toute modification même faible de la concentration en ces deux substances connues mais à côté desquelles, grâce à une analyse plus complète, des milieux de culture bactériens, d'autres seront peut-être découvertes. A cet égard le travail que vient de publier FALLOT (1964) révèle combien sont importantes, mais encore peu étudiées, les actions possibles des métabolites bactériens sur la physiologie et l'organogénèse même des tissus végétaux. En effet, au cours de ses travaux, des calcs formés sur des cultures de fragments de topinambour en présence d'*Azotobacter chroococcum* présentent (FALLOT et ROUCH, 1964) certains caractères histologiques obtenus aussi sous l'action de l'acide indole-acétique. Par contre, en présence de *Bacillus megaterium* la structure est très particulière et ne peut être rapprochée de l'action histologique d'aucune autre substance connue (1). PHILIPSON et SHEAT (1963), de leur côté, ont pu provoquer, en présence d'*Escherichia coli*, la formation de calcs à l'extrémité décapitée d'axes hypocotylés d'*Helianthus*.

En nous appuyant sur les faits expérimentaux rappelés ci-dessus et issus tant de nos propres travaux que de ceux d'autres chercheurs, nous pensons comme POCHON et DE BARJAC (1958) pour conclure cette partie de la discussion, que : « Les inter-actions entre plantes et micro-organismes constituent un sujet dont les vastes domaines sont encore presque inexplorés sauf dans le cas des symbioses et des actions pathogènes. Pourtant ces inter-actions sont capitales. Elles représentent l'une des pierres de touche de la microbiologie des sols puisque par elles cette microbiologie s'impose et s'intègre à la physiologie végétale et à la botanique ».

(1) « La haute activité des composés élaborés par les bactéries dépasse, dit cet auteur, celle d'autres substances stimulantes connues ».

NYSTERAKIS (1961-62-63) parvient lui aussi à des constatations analogues dans l'étude des phénomènes liés à l'inhibition de la germination par des jus de fruits mûrs.

10. Signification de la diminution du peuplement bactérien.

Mais revenons à l'évolution du peuplement bactérien pour considérer cette fois la diminution du nombre de micro-organismes qui suit assez rapidement et irrémédiablement pourrait-on dire la période d'activité dont nous venons d'examiner certaines conséquences.

Cette régression débute, nous l'avons vu, au moment où les bourgeons commencent à se développer et les pousses à s'allonger.

Comment comprendre ce phénomène ?

Il peut s'agir d'abord comme nous l'avons déjà évoqué, d'une réaction de défense des cellules avec intervention d'un antibiotique naturel survenant à un moment particulier de la physiologie de l'hôte et plus précisément en relation directe, comme les travaux de VICENTE JORDANA (1960) et les nôtres le laissent prévoir, avec le déroulement du bourgeonnement.

Une autre explication est possible. A mesure que les jeunes pousses se développent, les bactéries, en migrant par l'intermédiaire des vaisseaux conducteurs passeraient dans les tissus nouvellement formés en provoquant *ipso facto* la diminution du peuplement au sein des tubercules. Il en va sans doute ainsi en partie du moins, puisque l'on a pu observer des micro-organismes dans les vaisseaux ; mais ce n'est certainement pas la cause essentielle étant donné qu'assez fréquemment ce sont les cellules parenchymateuses qui hébergent les bactéries.

On peut enfin concevoir que les bactéries contrôleraient elles-mêmes leur développement. Elles seraient la cause de leur propre destruction. Cela se produit, on le sait, dans des bouillons de cultures âgées où, au cours de la lyse bactérienne sont libérées des substances toxiques pour les bactéries. Naturellement, *in vivo*, les modalités pourraient être différentes et l'autolyse survenir, par exemple, lorsqu'un certain équilibre entre les bactéries et les plantes a été dépassé.

Une revue générale de la littérature scientifique consacrée à la lyse bactérienne a été publiée par WELSCH (1958). Dans le problème qui nous préoccupe, différents types d'enzymes pourraient intervenir :

— des lysozymes synthétisables par les tissus végétaux (SALTON, 1958) ou des micro-organismes : *Bacillus subtilis*, par exemple, pendant la phase exponentielle de sa croissance (RICHMOND, 1957) ;

— des enzymes prenant naissance au moment de la sporulation de certains *Bacillus* (STRANGE et DARK, 1957) : par exemple, parmi les espèces que nous avons isolées, les spores de *B. cereus*, *B. subtilis*, *B. licheniformis* et *B. megaterium* contiennent des facteurs de dégradation des cellules végétatives à l'égard de leur espèce et aussi des autres ;

— des enzymes autolytiques qui ne détruisent que localement la paroi bactérienne (NORRIS, 1957).

Les corps libérés au cours de la destruction des micro-organismes pourraient d'ailleurs intervenir également dans le métabolisme de la plante. Cela est important, comme le faisait remarquer HIRTH après la note de FALLOT (1964). Cette éventualité mériterait d'être précisée en séparant les différents produits formés dans les bouillons de cultures

âgées et étudiant leur action sur les tubercules de pomme de terre. Cette remarque étend davantage encore les possibilités d'intervention des bactéries dans le métabolisme de la plante-hôte.

11. Possibilité de la fixation d'azote.

Y a-t-il parmi les germes isolés des fixateurs d'azote ?

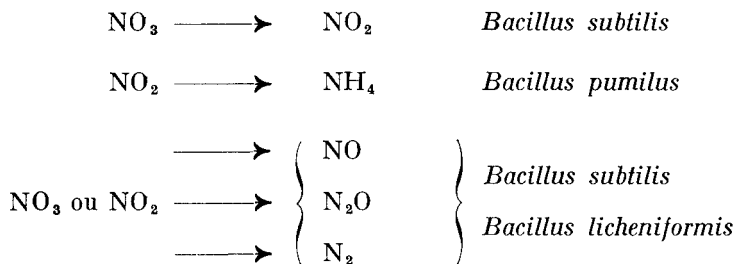
D'après les travaux récents, 3 espèces le seraient :

- *Bacillus polymyxa* : HAMILTON et WILSON, 1955 ;
GRAU et WILSON, 1964.
- *Aerobacter aerogenes* : JENSEN, 1956.
- *Achromobacter sp.* : PROCTOR et WILSON, 1958.

La fixation d'azote par ces micro-organismes s'effectuerait essentiellement en anaérobiose. En présence de 10 % d'oxygène le taux de fixation ne représente plus que 0,3 % de ce qu'il était en anaérobiose (HINO et WILSON, 1958).

Selon MORTENSON (1962) la découverte de nouveaux organismes fixateurs d'azote permet de penser que leur liste va s'étendre. On pourrait en particulier, et l'emploi de l'azote 15 facilite les recherches, déceler de nouveaux micro-organismes fixateurs d'azote en opérant sous faible pression d'oxygène.

Parmi les espèces bactériennes isolées un certain nombre peuvent intervenir dans le métabolisme de l'azote :



Tous les travaux auxquels il vient d'être fait allusion, sont effectués *in vitro*. *In vivo* les phénomènes sont certainement très différents : on sait par exemple que la fixation de l'azote par le *Rhizobium* n'est possible qu'*in vivo*, dans les nodosités.

Les résultats que nous avons obtenus en plaçant des fragments de betterave sous atmosphère d'azote laisseraient penser qu'*in situ* les bactéries pourraient intervenir dans le métabolisme de l'azote.

En effet, l'observation des noyaux et des nucléoles dans le matériel ainsi traité révèle une hyperactivité cellulaire cytologiquement caractérisée par un intense bourgeonnement nucléolaire, l'extrusion d'acide ribo-nucléique dans le cytoplasme et même, si l'action se prolonge par la division de certains noyaux.

Les dosages chimiques confirment bien l'existence de synthèses protidiques puisque à la fin de l'expérience la teneur en azote total des tissus a augmenté. Les résultats de tels dosages effectués après séjour des fragments dans l'azote 15 renforcent encore cette constatation.

Pour expliquer cette augmentation d'azote total, il faut bien admettre, en l'état actuel des connaissances que, dans le cadre de nos travaux, la fixation de l'azote passerait par l'intermédiaire des bactéries. Il faut cependant écarter, de façon formelle toute envie de généraliser hâtivement ce résultat obtenu, soulignons-le, dans des conditions précises de séjour en atmosphère enrichie en azote. Le petit nombre de bactéries présentes dans les tissus normaux empêche de considérer le processus comme une voie importante (voire unique) d'enrichissement en substances azotées.

Les conditions expérimentales favorisent sans doute ici un phénomène qui, normalement, n'interviendrait que très faiblement.

Un certain nombre de travaux ont établi la possibilité de la fixation de l'azote atmosphérique par des plantes n'appartenant pas à la famille des Légumineuses (LIPMANN et TAYLOR, 1922 ; RUBEN, HASSID et KAMEN, 1940 ; BOND et GARDNER, 1957 ; GARDNER, 1958). Ils sont en général accueillis avec beaucoup de réserve. Les techniques modernes, notamment l'emploi de l'azote radioactif, seraient susceptibles d'aboutir sans doute à des résultats plus précis.

12. Nature des relations existant entre les bactéries et les plantes supérieures étudiées.

Quelle est donc, dans le cadre de nos travaux, la nature des relations entre les bactéries et leur hôte ? Quelle réponse apporter à l'analyse théorique que nous avons faite de cette question ? Quelle solution adopter : l'inertie, la passivité ou l'intervention ?

A dire vrai, il existe encore deux autres façons de répondre : la première, par défaut ; la seconde, par excès ; elles nous ont parfois été proposées, elles sont très éloignées l'une de l'autre, opposées même et finalement contradictoires.

Pour les uns, il n'y a pas de relations puisqu'il n'y a pas de bactéries dans les cellules : nos résultats sont tout à fait insolites et les bactéries isolées et cultivées proviennent, pensent-ils, simplement de pollutions de laboratoire, nos manipulations n'étant pas aseptiques.

Nous comprenons très bien cette objection mais nous l'avons déjà réfutée (p. 153). Nous ne pensons pouvoir mieux faire finalement, puisqu'il s'agit ici de techniques expérimentales, que d'engager vivement les chercheurs qui formuleraient cette critique à refaire personnellement certaines des manipulations très simples exposées dans ce mémoire (l'immersion dans le sublimé, par exemple, p. 110).

Pour les autres il y a bien des bactéries dans les cellules ; le fait n'est pas du tout insolite mais tellement connu (j'ai déjà souligné la contradiction avec l'hypothèse précédente) qu'il en devient une banalité. On conviendra facilement pourtant que les publications sur ce sujet ne sont pas nombreuses. Il est donc par conséquent, à notre avis tout à fait injustifié de considérer *a priori* cette question comme dénuée d'intérêt, c'est une éventualité, nous le reconnaissons volontiers, mais

on ne peut en décider bien entendu qu'après avoir acquis un minimum de connaissances de base. C'est précisément cela notre but.

Ayant écarté ces deux conceptions abusives, il reste à se prononcer pour l'une des trois possibilités évoquées plus haut.

Nous le ferons sans aucune hésitation : nous concluons à l'*intervention* des micro-organismes dans la vie de l'hôte, au moins dans le cas particulier de la pomme de terre.

Voici la progression de notre raisonnement :

- 1° les variations fréquentes et importantes du nombre de bactéries montrent qu'elles participent à la vie de l'organe ;
- 2° les résultats des analyses et dosages biologiques *in vitro* et *in vivo* apportent la preuve que les micro-organismes sont capables de produire des substances de croissance actives sur le métabolisme des cellules de la plante ;
- 3° enfin, l'inhibition bactérienne consécutive à l'emploi d'antibiotiques, provoque des modifications physiologiques allant jusqu'à la suppression du bourgeonnement. Ceci indique par conséquent que les substances de croissance évoquées ci-dessus, sont produites, au moins en partie, par les micro-organismes et interviennent dans la vie de l'hôte.

Dans ces conditions peut-on parler de symbiose ?

Nous ne nous étendrons pas longuement sur cette interrogation, ni ne lui donnerons une réponse bien tranchée ; elle risquerait, trop hâtive, d'être trop fragile. Une discussion comme celle-là demanderait un certain recul ; elle nécessiterait une acquisition encore plus grande de faits expérimentaux dont la réalisation sort nécessairement du cadre de ce travail.

Naturellement, dans ce genre de problème, les malentendus naissent souvent de ce que les auteurs ne donnent aux termes le même contenu. Il importe donc d'être à la fois prudent et précis.

La définition la plus généralement adoptée est celle de DE BARY (1879), créateur du terme. Selon lui la symbiose est l'association intime et habituelle de deux organismes dissemblables à qui des rapports mutuels assurent des bénéfices réciproques.

On ajoute quelquefois un qualificatif de plus à cette association : on précise spécifique.

Décider de l'existence d'une symbiose est aussi difficile que de tracer une frontière nette entre la maladie et la santé. En effet, comme cela est fréquent pour les phénomènes biologiques, les passages sont très progressifs ; les limites entre les cas de symbiose *sensu stricto* et ceux d'associations moins spécifiques, aux bénéfices unilatéraux, voire discutables, sont souvent très difficiles à tracer.

Dans les cas bien nets de symbiose, celle des *Rhizobium* et des Légumineuses, par exemple, les associés échangent des éléments trophiques en quantité relativement importante (glucides et produits azotés). Il n'en va pas de même, au moins dans l'état actuel des travaux, pour les associations étudiées dans ce travail. Ici, les bactéries fourniraient à la plante, à très faible dose des éléments de type catalytique ou oligodynamique. Il n'y a donc pas, dans les relations des associés, de différence de nature mais simplement de degré. C'est pourquoi nous ne pensons

pas que ce fait soit suffisant à lui seul pour écarter délibérément l'hypothèse de la symbiose.

Pour MARIAT (1951), l'échange des métabolites essentiels que sont les facteurs de croissance vitaminiques suffit pour que l'association entre dans le cadre de la symbiose. Ces facteurs interviennent d'ailleurs également dans les relations entre *Rhizobium* et Légumineuses (ALLISON et Coll., 1934 ; Mc BURNEY et Coll., 1935 et DEMOLON, 1951) en même temps que l'acide indole-acétique dont la présence a été signalée dans les nodosités (LEFEVRE, 1939 ; LINK et EGGER, 1940 et THIMAN et SKOOG, 1940).

Cela dit, on peut donc considérer semble-t-il, qu'il y a bien dans les tubercules de pomme de terre, objet essentiel de nos recherches, bénéfiques réciproques entre les associés. Mais si l'on peut répondre affirmativement à la première exigence de la définition de DE BARY qui veut que l'union soit intime, il est bien difficile de se prononcer sur les autres qualificatifs la voulant habituelle et spécifique.

Habituelle, l'association l'est vraisemblablement car la très grande majorité des tubercules étudiés hébergent des bactéries. On peut même penser qu'il en va ainsi pour la totalité de ces organes puisque les techniques d'isolement employées n'explorent en fait qu'une faible partie des tissus.

A l'égard de la spécificité nous ne pouvons nous prononcer affirmativement en raison de la très grande ubiquité des espèces bactériennes isolées.

Pour l'ensemble de ces raisons, dans l'état actuel de nos recherches, nous ne considérons pas les associations étudiées comme relevant de la symbiose *sensu stricto*.

13. Comment intégrer nos recherches dans le contexte scientifique.

Touchant presque au terme de cet exposé et malgré l'impression de n'avoir abordé qu'une étroite partie du sujet, c'est cependant dans le domaine des considérations générales que nous voudrions rester quelques instants encore pour tenter d'intégrer, à titre de pure hypothèse, notre travail dans un ensemble plus vaste.

Les relations bactéries-plantes bien connues aujourd'hui dans la famille des Légumineuses et quelques autres, représentent un état de perfection très poussé dans l'association de deux organismes dissemblables. Des échanges mutuels très précis et complémentaires s'effectuent au niveau d'organes parfaitement spécialisés dans lesquels la densité bactérienne est très forte. Cette perfection témoigne d'un équilibre certainement complexe et par conséquent fragile entre beaucoup de facteurs, internes et externes. Parmi ces derniers, la composition de l'atmosphère et en particulier le rapport O_2/N_2 a pu constituer un cadre dans lequel cette association a évolué jusqu'au stade que nous connaissons. En d'autres termes la composition atmosphérique actuelle serait un facteur déterminant ayant porté l'accord des *Rhizobium* et des Légumineuses à un niveau de perfectionnement très élevé, caractérisé essentiellement par la concentration des micro-organismes dans des organes spécialisés.

Les associations étudiées ici, par contre, en raison des exigences et des possibilités très différentes de leurs partenaires pourraient correspondre à des systèmes d'inter-relations qui trouveraient leur plein épanouissement dans d'autres conditions extérieures, en particulier atmosphériques, et qui, en voie de construction ou en cours de dégradation, seraient caractérisés par une dispersion très diffuse de bactéries peu nombreuses dans les organes.

Considérant donc nos travaux sous l'angle de l'évolution physiologique, nous serions ainsi en présence ou bien de vestiges d'associations en rupture d'équilibre ou bien de forme d' « adolescence » d'un accord qui se cherche.

Les phénomènes que nous avons étudiés pourraient d'une certaine manière prendre leur place dans la progression des relations générales nouées d'une part, entre les bactéries ou les champignons et, d'autre part, les plantes supérieures.

Dans le sol se développent une foule de micro-organismes, bactéries et champignons notamment, opérant un nombre considérable de transformations chimiques.

La zone proche des racines des végétaux supérieurs, la rhizosphère, constitue déjà un territoire tout à fait particulier, dans lequel, tout en restant parfaitement extérieur l'un à l'autre, par le jeu de leurs sécrétions réciproques les organismes entretiennent des relations trophiques ou hormonales de synergie ou d'antagonisme.

La progression se poursuit : les hyphes des champignons s'entremêlent et tissent autour des racines un manchon continu qui reste extérieur. Ce sont les mycorhizes ectotrophes. Parfois quelques hyphes arrivent à pénétrer dans les espaces intercellulaires.

Un pas de plus et les filaments mycéliens forcent la barrière des cellules et s'y développent abondamment : ce sont les mycorhizes endotrophes (Orchidées).

Nous pourrions placer ensuite les phénomènes que nous avons étudiés, caractérisés par la présence au sein des cellules de la plante, d'un faible nombre de bactéries appartenant à plusieurs espèces et dont la répartition est très diffuse.

Enfin, lorsqu'une seule espèce se multiplie abondamment dans les organes spécialisés de la plante (nodules) les relations semblent avoir atteint un état de grande perfection. Il serait bien entendu commode de pouvoir disposer d'un terme simple pour désigner les tissus sains qui hébergent des bactéries.

L'appellation *rhizosphère* s'applique à la zone du sol proche du système racinaire où se réalisent des rapports entre les racines et les bactéries du sol.

La *spermosphère* est le lieu précis, limité au pourtour de la graine, où s'établissent des échanges entre les micro-organismes telluriques et la graine en germination.

L'*histosphère* est un terme parfois utilisé pour parler de la terre qui se trouve en contact direct des radicelles.

L'ensemble des cellules d'un végétal qui sont susceptibles d'héberger des bactéries et de nouer des relations réciproques avec elles, pourrait, pensons-nous, s'appeler l'*endosphère*.

Conclusions générales

De l'ensemble des travaux consacrés à l'étude des bactéries hébergées par les cellules des plantes supérieures saines, à leur localisation, à leur intervention dans le métabolisme de l'hôte, nous pouvons, en ne retenant que l'essentiel, tirer les conclusions générales suivantes.

1° En appliquant les techniques classiques et aseptiques de la bactériologie nous avons à partir :

a) d'organes tubérisés de :

Solanum tuberosum, *Beta vulgaris*, *Daucus Carota*, *Cichorium Intybus*, *Helianthus tuberosus*, *Apium graveolens*, *Brassica Napus*, *Raphanus sativus* ;

b) de caryopses de *Triticum sativum* et *Zea Mays* ;

c) d'embryons de *Phaseolus vulgaris* ;

isolé diverses espèces bactériennes.

Les espèces le plus fréquemment isolées sont :

Sarcina, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas sp.*, *Achromobacter sp.*, *Flavobacterium sp.*, *Aerobacter cloaca*, *Klebsiella aerogenes*, *Paracoli aerogenoides*, *Proteus rettgeri*. Dans le genre *Bacillus* : *cereus*, *licheniformis*, *megaterium*, *subtilis*, *sphaericus*, *coagulans*, *polymyxa* et *pumilus*.

2° Des observations cytologiques après coloration différentielle effectuées dans les tissus tubérisés de pomme de terre ou de betterave et dans les différents organes issus de la germination stérile de caryopses de blé et de maïs, il résulte que :

a) les bactéries sont situées dans les cellules et généralement groupées en petites colonies muqueuses de 4 à 10 individus ; elles n'occupent pas de situation particulière au sein des cellules ;

b) dans les tubercules de pomme de terre au repos les bactéries se trouvent surtout dans les cellules parenchymateuses profondes ; au moment du bourgeonnement les micro-organismes, plus nombreux, sont souvent localisés de part et d'autre des éléments conducteurs du tubercule et aussi dans les jeunes pousses ;

c) les bactéries sont peu nombreuses dans les racines tubérisées de betterave ; le séjour dans l'azote gazeux provoque la multiplication des micro-organismes dans les cellules ;

d) dans les racines de carotte les bactéries se rencontrent surtout dans les vaisseaux ;

e) les micro-organismes sont présents en faible nombre dans les différents organes issus de la germination aseptique de caryopses stériles de blé et de maïs.

3° Outre la prolifération bactérienne, le séjour des fragments de betterave sous azote gazeux provoque la recrudescence des synthèses protéiques.

Ces résultats découlent : d'une part, de l'observation des images nucléaires et nucléolaires et, d'autre part, des dosages chimiques d'azote total effectués en particulier avant et après le séjour des fragments dans l'azote marqué 15.

4° En utilisant deux techniques différentes de dénombrement, le peuplement bactérien des tubercules de pomme de terre a été étudié de façon dynamique. Ceci aboutit aux résultats suivants :

a) pas de différence qualitative notable d'une variété de pomme de terre à l'autre ;

b) pas d'influence caractéristique des différents sols sur la nature des micro-organismes hébergés par une même variété.

c) en cours de végétation, dans les tubercules-mères, le nombre de bactéries tend à augmenter ;

d) pendant trois années consécutives au cours de la conservation hivernale, il s'est produit dans la période qui précède l'apparition des bourgeons une augmentation importante du peuplement bactérien : elle n'a pu être supprimée mais simplement retardée en soumettant les tubercules à l'action du froid ou de l'isopropyl-phényl-carbamate ;

e) le traitement par la rindite qui abrège la période de dormance provoque aussi la multiplication des micro-organismes au sein des cellules ;

f) le décalage croissant entre le peuplement de pommes de terre restées en végétation et celui de tubercules conservés au laboratoire après récolte, indique que les apports nutritifs ou les substances hormonales élaborées pendant la période de végétation réagissent sur le comportement des bactéries ;

g) enfin, le séjour sous vide, l'élévation de température et l'immersion dans un liquide, même antiseptique comme le sublimé, favorisent la multiplication bactérienne. L'oxygène a l'action inverse.

5° La plupart des espèces bactériennes isolées sont capables de produire *in vitro* de l'acide indole-acétique et une substance du groupe des gibbérélines.

Il existe *in vitro* un certain parallélisme entre la quantité de ces substances dans les tissus et le nombre de bactéries qui s'y trouvent.

6° Des antibiotiques, en particulier la kanamycine et la néomycine peuvent en agissant sur les bactéries et sans exercer d'action toxique sur les cellules végétales, inhiber complètement le bourgeonnement.

7° La gibbéréline est susceptible de rendre aux tubercules traités par l'antibiotique un certain pouvoir de bourgeonner.

Ces résultats, sur le plan théorique, suggèrent les hypothèses suivantes qui nous paraissent les plus plausibles :

a) l'apport d'auxine et de gibbéréline bactérienne serait une phase indispensable dans le mécanisme qui aboutit à l'émission des bourgeons ;

b) les micro-organismes par l'intermédiaire des substances de croissance qu'ils produisent pourraient contrôler la synthèse d' α amylase et intervenir par conséquent dans le processus du bourgeonnement ;

c) les bactéries interviendraient, dans certains cas, dans le métabolisme de l'azote favorisant notamment les synthèses protidiques ;

d) à côté de l'auxine et de la substance du groupe des gibbérélines les micro-organismes seraient susceptibles de produire des métabolites particuliers qui agiraient sur la croissance de l'hôte, soit directement, soit par l'intermédiaire des auxines ;

e) on pourrait considérer les associations que nous avons étudiées, soit comme des formes dégradées d'associations plus parfaites, soit comme des ébauches de relations plus étroites ;

f) si l'on considère les relations entre : d'une part, les bactéries ou les champignons et, d'autre part, les plantes supérieures, on peut établir une progression régulière dans l'union de plus en plus étroite des associés. En voici quels seraient les différents stades :

- rhizosphère,
- mycorhizes ectotrophes,
- mycorhizes endotrophes,
- associations diffuses étudiées dans ce mémoire,
- relations très spécialisées (du type de celles qui lient les *Rhizobium* aux Légumineuses) ;

g) l'ensemble des cellules d'un végétal qui sont susceptibles d'héberger des bactéries pourrait s'appeler : l'*endosphère*.

ANNEXES

1. — EXTRAIT DE LA PRÉFACE DE L'OUVRAGE « LES SYMBIOTES », DE PORTIER

Tous les êtres vivants, tous les animaux, depuis l'Amibe jusqu'à l'Homme ; toutes les plantes, depuis les Cryptogames jusqu'aux Dicotylédones, sont constitués par l'association, l'emboîtement de deux êtres différents.

Chaque cellule vivante renferme dans son protoplasme des formations que les histologistes désignent sous le nom de mitochondries. Ces organites ne seraient pour moi autre chose que des bactéries symbiotiques, ce que je nomme des symbiotes.

Le symbiote est un micro-organisme qui possède deux propriétés remarquables : une extrême plasticité qui lui permet une adaptation aux conditions les plus variées et un pouvoir de synthèse très étendu, variable d'ailleurs avec les conditions dans lesquelles il est placé.

La bactérie symbiotique vient du milieu extérieur : elle peut, dans certains cas y retourner et vivre d'une vie indépendante. Les bactéries seraient donc les seuls êtres simples, tous les autres seraient doubles.

2. — COLORATION DE GRAM

Violet de gentiane :

Pulvériser au mortier 10 g de violet de gentiane pour bactériologie. Ajouter lentement 100 ml d'alcool éthylique à 95°. Filtrer.

Préparer par ailleurs :

Solution aqueuse d'acide phénique à 5 %

Solution aqueuse de gélatine à 0,2 %

A 100 ml de violet de gentiane on ajoute lentement 400 ml de la solution de gélatine filtrée et chaude (50° C). On place l'ensemble dans un flacon bouché à 37° C pendant 24 h. Mesurer 500 ml de la solution d'acide phénique et l'ajouter au

mélange en respectant la progression journalière suivante (exprimée en ml) : 0,1 - 0,2 - 1 - 2 - 10 - 20 - 50 - 100 - 100 - reste des 500 ml. Le mélange est laissé au repos pendant quatre jours puis filtré sur papier.

Solution iodo-iodurée (Iugol) :

Iode	1 g
Iodure de potassium	2 —
Eau distillée	100 ml

Placer l'iode et l'iodure dans un mortier. Ajouter l'eau progressivement.

Fuchsine phéniquée de Ziehl :

Fuchsine basique pour bactériologie	10 g
Acide phénique neigeux	50 —
Alcool éthylique à 90°	100 —
Eau distillée	1.000 ml

Coloration :

Prélever au fil droit une fraction de colonie ; l'étaler sur une lame porte objet après émulsion dans une goutte d'eau. Sécher et fixer par flambage. Recouvrir le frottis d'une quantité suffisante de solution de violet de gentiane. Laisser au contact une minute en remuant doucement la lame. Rejeter le violet et le remplacer par la solution iodo-iodurée ; laisser en contact pendant 15 à 20 s ; rejeter et remplacer par la même solution pendant le même temps. Ne pas laver et décolorer aussitôt par l'alcool éthylique à 95°. Arrêter la décoloration dès que l'alcool qui s'égoutte est incolore. Laver à l'eau courante. Recolorer à la fuchsine de Ziehl diluée au 1/10^e. La recoloration doit être courte et suivie aussitôt d'un abondant lavage à l'eau courante. Sécher.

Les bactéries qui ont fixé le premier colorant sont violet foncé : elles sont Gram positif ; celles qui ont été décolorées par l'alcool puis recolorées par la fuchsine sont roses ou rouge pâle : elles sont Gram négatif.

3. — COLORATION DES SPORES : MÉTHODE DE TRUJILLO

On utilise une solution aqueuse de vert malachite à 0,5 % (5 mn). On recouvre le frottis et chauffe jusqu'à émission de vapeur ; faire agir ensuite, pendant 20 s une solution aqueuse de fuchsine basique à 0,25 %.

Les spores sont vertes ; les bactéries rouges.

4. — MISE EN ÉVIDENCE DE LA CAPSULE : MÉTHODE DE BURRI

On dépose à la surface d'une lame parfaitement propre une goutte d'encre de Chine (marque Pelikan). S'il s'agit d'une colonie en prélever au fil droit un fragment et l'émulsionner dans l'encre. S'il s'agit d'une culture en bouillon déposer une gouttelette à côté de celle d'encre de Chine et les mélanger avec l'angle d'une lamelle couvre-objet. On recouvre d'une lamelle et comprime doucement sous un papier buvard. On examine à l'immersion en lumière ordinaire ou mieux en contraste de phase.

5. — BOUILLON NUTRITIF

Il comprend :

Extrait de viande	10 g
Peptone (oxoïd)	10 -
Chlorure de sodium	5 -
Glucose	20 -
Eau distillée	1.000 ml

On chauffe doucement jusqu'à dissolution parfaite. On ajuste le pH à 7 - 7,2
On répartit dans les tubes et passe à l'autoclave à 120° C pendant 20 mn.

6. — GÉLOSE NUTRITIVE

A 1.000 ml du bouillon nutritif précédent on ajoute 15 g d'agar (Difco). Porter à ébullition lente avec précaution.

On répartit en boîtes de Pétri ou en tubes ; stérilise 20 mn à 120° C. On laisse refroidir les tubes en position inclinée pour obtenir une large surface de culture.

7. — TRANCHES DE POMME DE TERRE

On découpe dans de gros tubercules lavés et épluchés des tranches de 6 mm environ d'épaisseur. On les dépose dans des boîtes de Pétri renfermant un peu d'eau. On passe à l'autoclave à 120° C pendant 40 mn. Onensemence au fil de platine en stries parallèles.

8. — MILIEU DE BEERENS ET GUILLAUME POUR LA RECHERCHE DE L'ACÉTYL-MÉTHYLCARBINOL

Extrait de viande	3 g
Peptone tryptique	20 -
Extrait de levure	3 -
Chlorure de sodium	5 -
Agar	15 -
Eau distillée	900 ml

Cette formule convient pour les aérobies. Si l'on désire étudier des anaérobies, il faut :

Ajouter 0,5 g de cystéine (chlorhydrate) et réduire à 0,5 g la quantité d'agar.

Ajuster à pH 7,2 ; répartir à raison de 9 ml. par tube. Après stérilisation à l'autoclave 20 mn à 120° C, ajouter stérilement dans chaque tube 1 ml d'une solution de glucose à 50 % stérilisée par filtration sur bougie Chamberland L 3. La concentration en sucre du milieu est donc de 5 %. Mélanger. Laisser refroidir verticalement pour les anaérobies, en position inclinée (butte et tranche) pour les aérobies.

Ensemencer les tubes verticaux par inoculation en profondeur : les tubes inclinés sur la tranche en stries serrées.

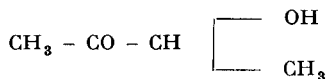
Incuber à 30° C, 24 à 48 h.

Ajouter alors (méthode de BARRIT) (1936) :

20 gouttes de soude à 16 %,

10 gouttes d'une solution alcoolique (60°) d'α naphтол fraîchement préparée.

La réaction se lit très facilement : une coloration rouge groseille indique que l'espèce étudiée produit de l'acétyl-méthyl-carbinol.



9. — MILIEUX SUCRÉS POUR L'ÉTUDE DES FERMENTATIONS

La composition du milieu, qui nous a été fournie par l'Institut Pasteur de Lille diffère selon que l'on veut étudier des

- bactéries sporulées à Gram positif,
- bactéries non sporulées à Gram négatif.

A) Milieu sucré pour les Gram + sporulées (Bacillaceæ).

Préparer :

Phosphate monoammonique	1 g
Chlorure de potassium	0,2 —
Sulfate de magnésium	0,2 —
Agar	15 —
Eau distillée	1.000 ml
Solution de bromocrésol pourpre à 0,041 % (virage 5,2 — 6,8)	12 ml

Ajuster le pH à 7 et porter à ébullition. Après filtration on répartit à raison de 5 ml par tube. On ajoute ensuite à chacun d'eux après stérilisation et refroidissement à 50-60° C, 10 gouttes d'une solution de sucre stérilisée par filtration sur bougie Chamberland L 3 à :

- 10 % pour le xylose, le glucose, le mannitol, le lactose et le saccharose ;
- 5 % pour les autres sucres : arabinose.

Laisser solidifier en position inclinée pour obtenir une butte et une tranche, et ensemencer en stries serrées.

La dégradation des sucres, si elle a lieu, entraîne le virage de l'indicateur du pourpre au jaune.

B) Milieu sucré pour les Gram — non sporulées (Pseudomonaceæ et Enterobacteriaceæ).

Préparer :

Peptone (Oxoïd)	2 g
Extrait de viande	1 —
Protéose peptone n° 3 (Difco)	2 —
Chlorure de sodium	5 —
Eau distillée	1.000 ml
Rouge de phénol (virage 6,8 — 8,4)	0,018 g

On ajuste le pH à 7,2. Comme précédemment on ajoute les solutions sucrées préalablement stérilisées sur bougie.

Un pouvoir de fermentation se traduit, au sein de ce milieu liquide, par le virage de l'indicateur coloré du rouge au jaune.

10. — MILIEU POUR LA RECHERCHE DES GAZ

La composition de ce milieu est identique à celle des milieux sucrés (A. 9).

Pour les Gram + sporulées on supprime l'agar : le milieu est donc liquide comme pour les Gram — non sporulées.

On répartit en tubes (environ 10 ml) dans lesquels on a introduit un petit tube qui joue le rôle de cloche à gaz. On stérilise comme ci-dessus.

Si l'espèce ensemencée est productrice de gaz, celui-ci sera recueilli par la cloche qui peut, lorsque le dégagement est important, être entraînée vers la surface.

11. — GEL D'AMIDON

Employer le milieu suivant :

Gélose nutritive ordinaire (A. 6) sans glucose . . .	1.000 ml
Amidon de pomme de terre.	10 g

Délayer progressivement en agitant constamment et chauffant doucement. Répartir en tubes 200 × 20 à raison de 20 ml.

Stériliser à l'autoclave 20 mn à 100° C.

Au moment de l'emploi, faire fondre au bain-marie bouillant. Couler en boîtes de Pétri ; agiter pour homogénéiser. Après refroidissement ensemencer au centre de la boîte en une seule touche. Incuber à 30° C pendant 1 à 8 jours. Quand le développement de la colonie est suffisant, verser à la surface du milieu de l'alcool éthylique à 95° ; elle s'opacifie et devient blanchâtre sauf dans la zone où l'amidon a été hydrolysé ; à cet endroit, autour de la colonie, la gélose est transparente.

12. — MILIEU DE SIMMONS : UTILISATION DU CITRATE

Sulfate de magnésium	0,2 g
Phosphate monoammonique	1 —
Phosphate bipotassique	1 —
Citrate de sodium	1 —
Chlorure de sodium	5 —
Bleu de bromothymol	0,08 —
Agar	13 —
Eau distillée	1.000 ml

Dissoudre par chauffage. Ajuster le pH à 6,8. Répartir dans des tubes neufs très soigneusement lavés (il faut éviter pour ce test toute trace de carbone organique).

Répartir en tubes de 160 × 16 à raison de 5 ml par tube. Passer à l'autoclave 20 mn à 120° C. Laisser refroidir en position inclinée pour obtenir une butte et une tranche. On ensemence la tranche en évitant tout apport de milieu étranger et incube à 30° C pendant 1 à 10 jours en observant les résultats chaque jour. Si le milieu devient bleuté ou tend progressivement vers le bleu outre-mer, le citrate est utilisé.

13. — MILIEU DE CHRISTENSEN : RECHERCHE DE L'UREASE

Peptone bactériologique	1 g
Glucose	1 —
Phosphate monopotassique	2 —
Chlorure de sodium	5 —
Agar en poudre	20 —
Eau distillée	1.000 ml
Solution de rouge de phénol à 0,4 %	3 —

En portant à l'ébullition on ajuste le pH à 7.

On répartit à raison de 5 ml par tube, stérilise 15 mn à 120° C. Après refroidissement jusqu'à 50-55° C on ajoute aseptiquement à chaque tube 0,5 ml d'une solution d'urée à 20 % dans l'eau distillée, stérilisée préalablement par filtration sur bougie Chamberland L 3. On laisse solidifier en position inclinée pour obtenir une petite tranche et un gros culot.

On ensemence la tranche, incube à 30 ou 37° C pendant 1 à 6 jours. Le virage au rose puis au rouge traduit l'hydrolyse de l'urée.

14. — EAU PEPTONÉES : RECHERCHE DE L'INDOLE

On prépare :

Peptone pancréatique exempte d'indole	10 g
Chlorure de sodium	5 —
Eau distillée	1.000 ml

Ajuster le pH à 7,2. Répartir en tubes (5 à 10 ml) ; stériliser 20 mn à 120° C. Incuber 24-48 h à 37° C.

On ajoute alors dans chaque tube :

- 3 gouttes d'une solution de nitrite de potassium à 1/10.000
- 5 gouttes d'acide sulfurique pur.

En présence d'indole on observe après agitation une coloration rouge que l'on peut rassembler en surface par addition d'alcool amylique.

15. — MILIEU POUR LA RECHERCHE DES NITRITES

Préparer :

Peptone	20 g
Chlorure de sodium	5 —
Eau distillée	1.000 ml

Ce milieu peut être additionné ou non de

Nitrate de potassium 10 g

suivant que l'on veut mettre en évidence la formation de nitrites soit directement à partir de la peptone, soit à partir du nitrate.

Répartir en tubes. Stériliser à l'autoclave 20 mn à 120° C.

Ensemencer. Incuber 24 h à 37° C.

La recherche des nitrites est effectuée en versant dans chaque tube de culture : 1 ml d'une solution d'acide sulfanilique à 0,2 % dans l'acide acétique à 30 %,

Quelques gouttes d'une solution d' α -naphtylamine à 0,5 % dans l'acide acétique à 30 %.

L'apparition d'une coloration rouge traduit la présence de nitrites. Certains germes sont capables de dépasser, en 24 h le stade des nitrites. Il faut alors rechercher ceux-ci plus précocement.

16. — MILIEU GÉLATINE

Préparer :

Extrait de viande	3 g
Peptone	5 -
Gélatine	120 -
Eau distillée	1.000 ml

Chauffer à 50° C pour dissoudre. Ajuster le pH à 6,8 - 7. Répartir en tubes de façon que la hauteur de milieu soit de 6 à 7 cm. Stériliser par passage à l'autoclave 30 mn. à 115° C. Laisser refroidir en culot.

Inoculer par piqure centrale en se servant d'un fil droit et long. Laisser les tubes à la température du laboratoire. Observer l'apparition de la liquéfaction : vitesse et forme. L'étude doit être prolongée pendant un mois. Il faut donc préserver le milieu de la dessiccation (recouvrir les tubes d'un capuchon de caoutchouc).

17. — MILIEU AU LAIT

Il comporte :

Lait sec et écrémé	100 g
Bromocrésol pourpre	0,04 -
Eau distillée	1.000 ml

On répartit dans les tubes, stérilise 20 mn à 120° C et ensemence.

Après incubation on notera :

- coagulation par acidification. L'hydrolyse du lactose acidifie le milieu et le fait virer au jaune ;
- coagulation sans acidification : le liquide reste bleu-violet ;
- digestion du caillot consécutive à l'action d'un enzyme protéolytique.

18. — MILIEU POUR LA RECHERCHE DE LA LECITHINASE

Préparer :

Extrait de viande	6 g
Peptone	10 -
Chlorure de sodium	5 -
Agar	15 -
Eau distillée	1.000 ml

Dissoudre à chaud. Ajuster le pH à 7. Répartir à raison de 20 ml par tube. Stériliser 20 mn à 120° C.

Au moment de l'emploi, après fusion et refroidissement à 45-50° C on ajoute au contenu de chaque tube 2,5 ml de lécithine obtenue en diluant dans 250 ml d'eau stérile un jaune d'œuf prélevé aseptiquement. On coule en boîte de Pétri.

On ensemence par piqûre au centre de la boîte. Après 48 h d'incubation à 30° C la présence d'une lécithinase se traduit par l'apparition d'une zone opaque autour de la colonie. Dans certains cas, la précipitation est limitée à la zone recouverte par la colonie ; on dit alors qu'elle est réduite.

19. — MILIEU V-L : AEROBIOSE-ANAEROBIOSE

Ce milieu qui contient de l'extrait de viande (V) et de la levure (L) est ainsi composé :

Peptone tryptique	10 g
Chlorure de sodium	5 -
Extrait de viande	2 -
Extrait de levure	5 -
Chlorhydrate de cystéine	0,3 -
Agar	6 -
Eau ordinaire	1.000 ml

On ramène le pH à 7,2 puis on répartit à raison de 4 ml par tube de 170 × 8. Stériliser à l'autoclave 20 mn à 115° C. Laisser refroidir à 45° C et ensemencer avec une pipette Pasteur fermée, préalablement plongée dans une suspension microbienne, en ayant soin de répartir l'inoculum dans tout le volume de milieu.

Chaque bactérie a ses niveaux spécifiques de développement optimum et on détermine ainsi son type respiratoire.

20. — MILIEU POUR L'ÉTUDE DE LA MOBILITÉ

On utilise le milieu :

Peptone	10 g
Chlorure de sodium	5 -
Agar	5 -
Eau distillée	1.000 ml

Dissoudre par chauffage. Ajuster le pH à 7,2. Répartir en tubes de 160 × 16 à raison de 8 ml environ par tube. Stériliser à 120° C pendant 20 mn. Laisser refroidir en position droite pour obtenir un culot.

Prélever une trace de culture à l'aide d'un fil bien droit et assez long. Ensemencer en piqûre centrale et verticale dans le culot de gélose molle.

Incuber à 37° C pendant 24 h ou plus. La mobilité du germe se traduit de la façon suivante :

- espèce immobile : piqûre fine nette ;
- espèce peu mobile : de chaque côté de la piqûre on observe de petits diverticules qui tendent à gagner les parois ;
- espèce mobile ou très mobile : la piqûre disparaît presque ; elle est noyée dans la masse microbienne qui envahit le milieu.

21. — TEST DU ROUGE DE MÉTHYLE

Préparer (milieu de CLARK et LUBS) :

Peptone trypsique	10 g
Phosphate bipotassique	2 —
Glucose	10 —
Eau distillée	1.000 ml

Dissoudre par chauffage. Ajuster le pH à 7,5. Répartir en tubes. Stériliser 20 mn à 120° C. Ensemencer. Incuber à 30 ou 37° pendant 24-48 h.

A 1 ou 2 ml de la culture, on ajoute :

2 gouttes d'une solution de rouge de méthyle à 0,5 % dans l'alcool à 60°.

Une teinte rouge indique que le pH est inférieur à 4,5 : la réaction est positive.

Une teinte jaune indique un pH supérieur à 6 : la réaction est négative.

22. — RECHERCHE DE L'HYDROGÈNE SULFURÉ

La réaction repose sur la réduction du sulfate ferreux en sulfure noir. On prépare :

Trypticase (B.B.L.)	20 g
Thiosulfate de sodium	1 —
Sulfate ferreux	0,2 —
Agar	12 —
Eau distillée	1.000 ml

Chauffer doucement pour dissoudre. Ajuster le pH à 7,2 - 7,4. Répartir en tubes. Stériliser 15 mn à 120° C. Laisser refroidir en position verticale.

Inoculer avec un peu de culture provenant d'un milieu solide, par piqûre centrale verticale et profonde. Incuber à 37° C pendant 10 jours. On observe chaque jour : le noircissement de la trace d'inoculation indique la production de H₂S.

23. — TRANSFORMATION DE LA PHÉNYL-ALANINE EN ACIDE PHÉNYL-PYRUVIQUE

On utilise le milieu :

Peptone	10 g
Phosphate bipotassique	1 —
Chlorure de sodium	5 —
Extrait de levure	3 —
d-1 phényl-alanine	2 —
Agar	12 —
Eau distillée	1.000 ml

Dissoudre en chauffant doucement et ajuster le pH à 7,2.

Répartir en tubes. Stériliser 20 mn à 120° C Laisser refroidir en position inclinée pour obtenir une longue tranche.

Ensemencer. Incuber 18 à 24 h à 37° C. Recouvrir la culture avec 5 à 6 gouttes de la solution suivante :

Solution à demi-saturation d'alun de fer	5 ml
Sulfate d'ammonium	2 g
Acide sulfurique à 10 %	1 ml

L'apparition rapide d'une coloration vert-franc est caractéristique de la transformation de la phényl-alanine en acide phényl-pyruvique.

24. — TEST AU CYANURE DE POTASSIUM

Technique de BUTTIAUX :

Préparer :

Peptone	10 g
Chlorure de sodium	5 —
Phosphate dissodique	5,63 —
Phosphate monopotassique	0,22 —
Agar	1 —
Eau distillée	1.000 ml

Dissoudre par chauffage et ajuster le pH à 7,5.

Répartir 2 ml par tube de 8 × 120 mm. Stériliser 20 mn à 120° C. Au moment de l'emploi ajouter 0,1 ml d'une solution de cyanure de potassium à 0,5 % dans l'eau, conservée au réfrigérateur mais non stérilisée.

Inoculer 3 doses bouclées de la culture de 18 à 24 h en eau peptonée du microbe à étudier ; les émulsionner dans la totalité du contenu du tube. Incuber à 37° C et examiner 18 à 24 h plus tard. Un disque blanc net à la surface du tube indique le développement de la bactérie (test +). La durée de la conservation de la solution de KCN est environ un mois à + 4° C.

25. — DÉCARBOXYLATION DES ACIDES AMINÉS

Technique de MOELER.

On prépare le milieu :

Peptone spéciale Orthana (1)	5	g
Extrait de viande de bœuf	5	—
Pyridoxal	0,005	—
Solution aqueuse de pourpre de bromocrésol à 1 p. 500	5	ml
Solution aqueuse de rouge de crésol à 1 p. 500	2,5	—
Glucose	0,5	g
Eau distillée	1.000	ml

Dissoudre et ajuster le pH à 6. Répartir en tubes (8 × 120 mm). Stériliser 15 mn à 120° C. Ajouter alors 1 ml de la solution d'acide aminé à :

- 1 % de L + lysine dihydrochlorohydrate,
- 1 % de L + arginine monohydrochlorohydrate,
- 1 % de L + ornithine dihydrochlorohydrate.

On ensemence chacun des tubes avec un peu de culture de 24 h sur gélose nutritive. On recouvre avec une couche d'huile de paraffine stérile (15 mm de hauteur). Incuber 4 jours à 37° C.

Si la coloration initialement jaune devient bleu-violet, la réaction est positive.

26. — RECHERCHE DE L'OXYDASE ET DE LA CYTOCHROME-OXYDASE

Déposer au centre d'un fragment de papier Whatman n° 1 placé sur une lame de verre 2 à 3 gouttes d'une solution aqueuse à 1 % de chlorhydrate de tétra-méthylpara-phénylène-diamine.

Prélever un peu de la colonie cultivée sur milieu solide et l'étaler sur le papier imbibé de réactif. S'il survient immédiatement après cette opération une coloration violet-brun, la réaction est positive.

27. — OXYDATION FERMENTATION DES HYDRATES DE CARBONE

Préparer le milieu de HUGH et LEIFSON :

Trypticase (B.B.L.)	2	g
Chlorure de sodium	5	—
Phosphate bipotassique	0,3	—
Agar	3	—
Bleu de bromothymol	0,03	—
Eau distillée	1.000	ml

(1) Fournie par : H. STRUERS. Skindergade 38. Copenhague, Danemark.

Ajuster le pH à 7,2. Répartir des culots de 5 cm de hauteur. Stériliser à l'autoclave 20 mn à 120° C. Au moment de l'emploi « régénérer » au bain-marie bouillant. Ajouter la solution d'hydrate de carbone stérilisée par filtration sur bougie Chamberland L 3. La concentration en sucre dans le milieu doit être de 1 %. Laisser refroidir verticalement. Inoculer, par piqûre centrale profonde, deux tubes pour chaque souche à étudier. L'un d'eux est recouvert d'huile de paraffine (1,5 cm) neutre et stérile. Incuber à la température qui convient le mieux et examiner journalièrement pendant 10 jours.

S'il ne se produit rien dans aucun des deux tubes l'espèce examinée est dite inerte pour le sucre étudié.

Si le virage au jaune n'apparaît que dans le tube non paraffiné il y a oxydation.

Si le virage se produit dans les deux tubes il y a fermentation.

Certaines bactéries enfin, alcalinisent le milieu non recouvert d'huile, elles sont dites alcalinisantes.

28. — PIGMENTATION : MILIEU DE KING

Ces deux milieux conviennent particulièrement aux *Pseudomonas* :

Milieu A.

Bacto-peptone (Difco)	20	g
Agar	15	—
Glycérol	10	—
Sulfate de potassium anhydre	10	—
Chlorure de magnésium anhydre.	1,4	—
Eau distillée	1.000	ml

Milieu B.

Protéose-peptone n° 3 (Difco)	20	g
Agar	15	—
Glycérol	10	—
Phosphate bi-potassique anhydre	1,5	—
Sulfate de magnésium, 7 H ₂ O.	1,5	—
Eau distillée	1.000	ml

Dans les deux cas ajuster le pH à 7,2. Répartir (20 ml) et stériliser 20 mn à 120° C. Au moment de l'emploi couler en boîte de Pétri.ensemencer en stries parallèles.

Observer les pigmentations éventuelles.

29. — MILIEU GÉLOSÉ TRYPTOSÉ POUR NUMÉRATIONS

On prépare :

Glucose	1	g
Tryptose (Difco)	20	—
Extrait de levure	3	—
Chlorure de sodium	5	—
Phosphate bipotassique	1	—
Bacto-agar (Difco)	10	—
Eau distillée	1.000	ml

Ce milieu est réparti à raison de 70 ml par tube de 25 × 250 mm. On stérilise par passage à l'autoclave 20 mn à 120° C.

Avant, l'emploi ce milieu est liquéfié au sein des tubes par un passage au bain-marie à 100° C et refroidissement lent jusqu'à la température d'utilisation (50° C).

30. — GÉLOSE BLANCHE

Bacto agar Difco	10 g
Eau distillée	1.000 ml

Stériliser 20 mn à 120° C. Répartir en tubes. Avant l'emploi porter au bain-marie et laisser refroidir lentement jusque 50°-55° C.

31. — MILIEU

POUR LA RECHERCHE DE L'ACIDE INDOLE-ACÉTIQUE

Ce milieu a été mis au point par BERTHELOT et AMOUREUX (1938), il comprend :

PO ₄ K ₂ H	0,75 g
PO ₄ K H ₂	0,75 —
SO ₄ Mg	0,5 —
SO ₄ (NH ₄) ₂	0,5 —
Chlorhydrate de cystéine	0,02 —
Tryptophane (1)	0,5 —
Pyruvate de sodium	5 —
Glucose	2,5 —
Eau distillée	1.000 ml

On ajoute 12 gouttes d'une solution minérale complexe (solution oligodynamique de BERTHELOT, 1934) renfermant pour un litre d'eau distillée :

(SO ₄) ₃ Fe ₂	50 g
SO ₄ Mn,7H ₂ O	2 —
SO ₄ Ca,2H ₂ O	0,5 —
Cl ₂ Ni,6H ₂ O	0,05 —
Cl ₂ Co,6H ₂ O	0,05 —
(SO ₄) ₂ Ti ₂	0,20 —
SO ₄ Zn,7H ₂ O	0,10 —
SO ₄ Cu,5H ₂ O	0,05 —
SO ₄ Gl,4H ₂ O	0,10 —
BO ₃ H ₃	0,05 —
SO ₄ H ₂ à 66° B°	1 ml

Ce milieu réparti dans des flacons d'Erlenmeyer à raison de 150 ml est stérilisé à l'autoclave 20 mn à 120° C.

(1) Il faut noter qu'il est souhaitable de ne pas introduire le tryptophane avant stérilisation. KULESCHA et GAUTHERET (1949) ont en effet montré que le tryptophane est une substance fragile ne supportant pas les températures habituelles de stérilisation et pouvant donner naissance à des substances auxiniques actives sur le test avoine. Nos dosages colorimétriques étant surtout qualitatifs nous n'avons pas pris la précaution d'ajouter le tryptophane après la stérilisation.

Bibliographie

- ALLEN E.K. et ALLEN O.N. — 1950. Biochemical and symbiotic properties of the *Rhizobia*. *Bact. Rev.*, **14**, 273-330 (415 ref.).
- ALLISON F.E. et HOOVER S.R. — 1934. An accessory factor for legume nodule bacteria. *J. Bacteriol.* U.S.A., **27**, 561-581.
- ALTMANN R. — 1890. Die Elementarorganismen und ihre Beziehungen zu den Zellen. Ed. Veit, Leipzig (160 p.).
- ANKER L. — 1953. The effect of indoleacetic acid and other growth promoting substances on the endogenous respiration of the *Avena* coleoptile. *Acta bot., neerl.*, **2**, 22-65. ou Doctoral Thesis. Univ. of Utrecht.
- APPLEMAN C.O. — 1914. Biochemical and physiological study of the rest period in the tubers of *Solanum tuberosum*. *Maryland Agr. Exp. St. Bull.*, **183**, 181-226.
- ARCULARIUS J.J. — 1928. Zytologische Untersuchungen an einigen endotrophen Mykorrhizen. *Zbl. Bakterid.*, Dtsch., **74**, 191-207.
- ARTSHWAGER E.F. — 1918. Anatomy of the potato plant with special reference to the ontogeny of the vascular system. *J. agric. Res.*, U.S.A., **14**, 221-252.
- ARTSHWAGER E.F. — 1924. Studies on the potato tubers. *J. agric. Res.*, U.S.A., **27**, 809-835.
- ATANASOFF D. — 1926. Sprain or internal brown spot of potatoes. *Phytopathology*, U.S.A., **16**, 711-722.
- AUDUS L.J. — 1959. Plant Growth substances. Ed. Leonard Hill Limited London (2^e éd., 553 p.).
- AYMARD J. — 1904. Les anesthésiques et le forçage des plantes. Imp. Hemelin frères, Montpellier (68 p.).
- BALOGH E., BOSZORMENTY I.Z. et CSEH E. — 1961. The effect of chloramphenicol on the amino acid metabolism and ion uptake of isolated wheat roots. *Biochem. Biophys. Acta.*, **52**, 381-83.
- BARRITT M.M. — 1936. The intensification of the Voges-Proskauer reaction by the addition of α Naphtol. *J. Pathol. Bact.*, **42**, 441-454.
- BARY (DE) A. — 1879. Die Erscheinung der Symbiose. Trad. dans *Rev. Intern. Sci.*, **3**, 301-309.
- BAUSOR S.C. — 1942. Effects of growth substances on reserve starch. *Bot. Gaz.*, U.S.A., **104**, 115-121.
- BEERENS H. et GUILLAUME J. — 1952-3. Mise en évidence de l'acétoïne produit par les bactéries : essai d'un milieu de recherche rapide. *Ann. Inst. Pasteur*, Lille, **5**, 133-138.
- BELTRA R. — 1959. El acido beta-indolacetico y los timores vegetales de origen bacteriano. *Revista latino-americana Microbiologia*, **2**, 23-31.
- BENNET-CLARK T.A., TAMBIAH M.S. et KEFFORD N.P. — 1952. Estimation of plant growth substances by partition chromatography. *Nature*, G.-B., **169**, p. 453.
- BENNET-CLARK T.A. et KEFFORD N.P. — 1953. Chromatography of growth substances in plant extracts. *Nature*, G.-B., **171**, p. 635.

- BERGEY'S. Manual of determinative bacteriology — 1957. The Williams and Wilkins C¹e (7^e ed.).
- BERNARD N. — 1902 a. Conditions physiques de la tubérisation chez les végétaux. *C. R. Acad. Sci., Fr.*, **135**, 706-708.
- BERNARD N. — 1902 b. Études sur la tubérisation. *Rev. Gén. Bot.*, **14**, 1-71 ; 101-183.
- BERNARD N. — 1909. L'évolution dans la symbiose. Les Orchidées et leurs champignons commensaux. *Ann. Sc. nat. Bot.*, **9**, 1-196.
- BERNARD N. — 1911 a. Sur la fonction fungicide des bulbes d'Ophrydées. *Ann. Sc. nat. Bot.* **14**, 221-234.
- BERNARD N. — 1911 b. Les mycorhizes des *Solanum*. *Ann. Sc. nat. Bot.*, **14**, 235-252.
- BERNARD (M^{me} N.) et MAGROU J. — 1911 c. Sur les mycorhizes des pommes de terre sauvages. *Ann. Sc. nat. Bot.*, **14**, 252-258.
- BERTHAULT P. — 1911. Recherches botaniques sur les variétés cultivées du *Solanum tuberosum* et les espèces sauvages de *Solanum* tubérifères voisins. *Thèse Doct. Sc. nat.*, Nancy (209 p.).
- BERSHOVA O.I. — 1959. Influence des oligoéléments sur la formation d'hétéroauxine par les microorganismes du sol. *Mikrobiol. Ukraïn. Zh.*, **21**, 3-10.
- BERTHELOT A. — 1934. Nouvelles remarques d'ordre chimique sur le choix des milieux de culture naturels et sur la manière de formuler les milieux synthétiques. *Bull. Soc. chim. biol.*, Fr., **16**, 1.553-57.
- BERTHELOT A. et AMOUREUX G. — 1938. Sur la formation d'acide indole-3-acétique dans l'action de *Bacterium tumefaciens* sur le tryptophane. *C. R. Acad. Sci.*, Paris, **206**, 537-540.
- BERTHOLD E. — 1917. Zür Kenntnis des Verhalten von Bacterien in Gewebe von Pflanzen. *Jahrb. wiss. Bot.*, Dtsch., **57**, 387-460.
- BERTHOLD G. — 1904. Untersuchungen zur Physiologie der pflanzlichen Organisation. Ed. Engelmann. Leipzig (261 p.).
- BITANCOURT A.A. — 1955. Recherches physiologiques sur les auxines. *Rev. Gén. Bot.*, Fr., **62**, 498-591.
- BLOMMAERT K.L.J. — 1954. Growth and inhibiting substances in relation to the rest period of the potato tuber. *Nature*, G.-B., **174**, p. 970.
- BOND G. et GARDNER I.C. — 1957. Nitrogen fixation in Non-Leguminous root nodule plants. *Nature*, G.-B., **179**, p. 680.
- BONNER J. — 1949. Limiting factors and growth inhibitors in the growth of *Avena* coleoptile. *Amer. Journ. Bot.*, **36**, 323-332.
- BOTTOMLEY W.B. — 1909. Some effects of nitrogen fixing bacteria on the growth of Non-Leguminous Plants. *Proc. r. Soc., Ser B*, G.-B., **31**, p. 287.
- BOYSEN-JENSEN P. — 1931. Über Wachstumsregulatoren bei Bakterien. *Biochem. J.*, G.-B., **236**, 205-210.
- BRASSE M.K. et NICKELL L.G. — 1952. Lack of effect of plant growth regulators on the action of alpha-amylase secreted by virus tumor tissue. *Bot. Gaz.*, U.S.A., **113**, 482-484.
- BRAUN A.C. — 1956. The activation of two growth substance systems accompanying the conversion of normal to tumor cells in crown-gall. *Cancer. Res.*, U.S.A., **16**, 53-56.
- BRIAN P.W. — 1959. Effects of gibberellins on plant growth and development. *Biol. Rev.*, G.-B., **34**, 37-84.
- BRIAN P.W. et HEMMING H.G. — 1957. A relation between the effects of G.A. and indolylacetic acid on plant cell extension. *Nature*, G.-B., **179**, p. 417.
- BIGGS D.E. — 1963. Biochemistry of barley germination : action of gibberellic acid on barley endosperm. *J. Inst. Brewing*, **69**, 13-19.
- BRUNGHORST J. — 1886. Über einige Wurzelanschwellungen, besonders diejenigen von *Alnus* und den Elaeagnaceen. *Bot. Inst. Tübingen Untersuch.*, **2**, 151-177.
- BUCHNER P. — 1918. Studien an intracellularen Symbioten. *Arch. Protistenk.*, Dtsch., **39**, 34-61.

- BUCHTA K. — 1949. Die Isolierung von Mikroorganismen aus Samen von Leguminosen. *Landw. Jahrbücher. Bayern*, **27**, 3-4.
- BUKATSCH F. et HEITZER J. — 1952. Beiträge zur Kenntnis der Physiologie von *Azotobacter*. *Arch. Mikrobiol.*, Dtsch., **17**, 79-96.
- BUKATSCH F., BURGER K. et SCHLUTER M. — 1956. Untersuchungen über Eiweiss und Eiweissstoffwechsel bei *Azotobacter* mit besonderer Berücksichtigung der Indolkörper. *Zbl. Bakt.*, Dtsch., **109**, 226-235.
- BULARD C. et MONIN J. — 1960. Graines et embryons dormants d'*Evonymus europaeus* : différentes modalités dans l'éveil de leur dormance par l'acide gibbéréllique. *C. R. Acad. Sci.*, Paris, **250**, 4.197-4.199.
- BULARD C., GUICHARDON B. et RIGAUD D. — 1963. Mise en évidence de substances de nature auxinique synthétisées par *Rhizobium* cultivé en présence de tryptophane. *Ann. Inst. Pasteur*, Paris, **105**, 150-157.
- BURCIK E. — 1940. Experimente und Bemerkungen zur Arbeit von H. SCHANDERL. *Planta*, Allem., **30**, 683-688.
- BURCIK E. — 1948. Eine Kritik der Symbiosetheorie von H. SCHANDERL auf Grund Neurei- gener Untersuchungen. *Arch. Mikrob.*, Dtsch., **14**, 309-333.
- BURGER K. et BUKATSCH F. — 1958. Über die Wuchsstoffsynthese im Boden frei lebender, stickstoffbinder Bakterien. *Zbl. Bakt.*, Dtsch., **111**, 1-28.
- BURKHOLDER P.R. — 1939. Production of growth substance by bacteria in media containing specific organic and inorganic nitrogenous compounds. *Amer. J. Bot.*, **26**, 422-428.
- BURRI R. — 1903. Bakterienvegetation auf der Oberfläche normal entwickelter Pflanzen. *Zbl. Bakt.*, Dtsch., **3**, 756-763.
- BUTLIAUX R., BEERENS H. et TACQUET A. — 1963. Manuel de techniques bactériologiques. *Ed. médicales Flammarion* (505 p.).
- CAPELLETTI C. — 1924. Reazione immunitaria nei tubercoli radicale Leguminose. *Ann. di Bot.*, **16**, 171-186.
- CAPELLETTI C. — 1933. Ricerche sulla microflora degli stimmi nelle piante alpine. *Ann. di Bot.*, **20**, 1-39.
- CAPELLETTI C. et CERUTI A. — 1939. Ricerche sulla microflora degli ovuli e degli stili di piante alpine. *Nuovo G. Bot. ital.*, **46**, 339-342.
- CAUDA A. — 1925. Maturazione dei frutti tannici. Ammezzimento. *Nuovo G. Bot. ital.*, **32**, 36-49.
- CAULLERY M. — 1922. Le parasitisme et la symbiose. *Gaston Doin Ed.*, Paris (400 p.).
- CHALVIGNAC A. — 1962. Incidence des *Azotobacter* sur la nutrition et la croissance du lin (*Linum usitatissimum*). *Agrochimica*, Ital., **6**, 286-292.
- CHAUVIN R. et LAVIE P. — 1956. Recherches sur la substance antibiotique du pollen. *Ann. Inst. Pasteur*, Paris, **90**, 523-527.
- CHAUVIN P. et LENORMAND E. — 1957. Composition et propriétés du pollen récolté par les abeilles. *Bull. Acad. nat. Méd.*, **141**, 35-37.
- CHEN W.K. — 1938. Production of growth substances by clover nodule bacteria. *Nature*, **142**, 753-754.
- CHOUARD P. — 1958. Les gibbéréllines : nouveaux facteurs de croissance des plantes à fleurs. *Rev. Hort.*, **130**, 1.792-1.803.
- COHENDY M. — 1912. Expériences sur la vie sans microbes. *Ann. Inst. Pasteur*, Paris, **26**, 106-137.
- COLIN H. et FRANQUET R. 1917. La genèse de l'amidon dans la pomme de terre. *Bull. Soc. Bot.*, Fr., **74**, 450-458.
- COVILLE F.V. — 1920. The influence of cold in stimulating the growth of plants. *J. Agric. Res.*, **20**, 151-160.
- COWDRY E.V. — 1923. The independance of mitochondria and the *Baccillus radiceicola* in root nodule. *Amer. Jour. Anatomy*, **31**, 339-343.

- DAWID W. — 1957. Untersuchungen über die Entwicklungsmöglichkeit von Bakterien aus normalen Tomatengewebe. *Z. Pflanzenkrankh.*, Dtsch., **64**, 205-214.
- DEMOLON A. — 1951. Contribution à l'étude de la symbiose bactérienne chez les Légumineuses. *Rev. Gén. Bot.*, Fr., **58**, 489-519 ; 562-612 ; 657-678, et **59**, 42-64.
- DENNY F.E. — 1926 a. Effect of thiourea upon bud inhibition and apical dominance of potato. *Bot. Gaz.*, U.S.A., **81**, 297-311.
- DENNY F.E. — 1926 b. Hastening the sprouting of dormant potato tubers. *Amer. J. Bot.*, **13**, 118-125.
- DENNY F.E. — 1929. Role of mother tuber in growth of potato plant. *Bot. Gaz.*, U.S.A., **87**, 157-194.
- DENNY F.E. — 1930. Sucrose and starch changes in potatoes treated with chemicals that break the rest period. *Amer. J. Bot.*, **17**, 806-817.
- DENNY F.E. et MILLER L.P. — 1932. Effect of ethylene chlorhydrin vapors upon dormant lilac tissues. *Contrib. Boyce Thompson Inst.*, **4**, 483-509.
- DI VESTEVA A. — 1888. De l'absence des microbes dans les tissus végétaux. *Ann. Inst. Pasteur*, Paris, **2**, 670-671.
- DOUIN R. — 1953. Sur la fixation de l'azote libre par les Myxophycées. *C. R. Acad. Sci.*, Paris, **236**, 956-958.
- DUBOIS R. — 1887. Les vacuolides. *C. R. Soc. Biol.*, Fr. (Mémoires), **34**, 9-16.
- DUCLAUX E. — 1885. Sur la germination dans un sol riche en matières organiques mais exempt de microbes. *C. R. Acad. Sci.*, Paris, **100**, 66-68.
- DUGGELI M. — 1905 et 1906. Die Bakterienflora gesunder Samen und daraus gezogener Keimpflanzen. *Zentrabl. Bakl.*, Dtsch., **12**, 602-614 ; 695-712. **13**, 56-63 ; 198-207.
- DUQUENOIS P. — 1955. Les antibiotiques des plantes supérieures. *Bull. Soc. Bot. Fr.*, **102**, 377-405.
- DUQUENOIS P. — 1958. Les antibiotiques des plantes supérieures. *Bull. Soc. Bot. Fr.*, **105**, 526-560.
- EIBNER R. — 1959. Untersuchungen über die « Eisenfleckigkeit » der Kartoffel. *Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades. Inst. für Phytopathologie der Justus-Liebig. Universität Giessen.*
- ELFVING F. — 1941. Elternross Bakterien. *Soc. Sci. fennica. Comment. Biol.*, **9**, 1-19.
- FABER F.C. (von). — 1914. Die Bakteriensymbiose der Rubiaceen (Erwiderung und ergänzende Mitteilungen). *Jahrb. wiss. Bot.*, **54**, 243-265.
- FALLOT J. — 1958. Induction, par *Bacillus megaterium*, de la prolifération *in vitro* des tissus de tiges de *Vitis rupestris*, prélevés pendant la période de repos végétatif. *C. R. Acad. Sci.*, Paris, **246**, 295-298.
- FALLOT J. — 1960. Prolifération *in vitro* des tissus de Topinambour due à l'action de *Bacillus megaterium*. *C. R. Acad. Sci.*, Paris, **251**, 1.088-1.090.
- FALLOT J. — 1960. Action positive de quelques microorganismes sur la prolifération *in vitro* des tissus de Topinambour. *Bull. Soc. fr. Physiol. végét.*, **6**, 90-91.
- FALLOT J. — 1964 a. Sur la prolifération des tissus de *Vitis* et d'autres végétaux. Rôle des bourgeons. Action des bactéries. *Thèse, Doct. Sc. Nat.*, Toulouse, Imprimerie du Sud (170 p.).
- FALLOT J. et ROUCH J. — 1964 b. Particularités des tissus de Topinambour cultivés *in vitro*, dues à l'action de quelques bactéries. *Rev. Cytol. Biol. végét.*, Fr., **27**, 259-267.
- FERENCZY L. — 1956 a. Antibacterial substances in seeds. *Nature*, G.-B., **178**, 639-640.
- FERENCZY L. — 1956 b. Antibacterial substances in seeds of *Fraxinus excelsior* L. *Acta biologica (Nova series) Szeged*, Hung., **2**, 13-14.
- FERNBACH — 1888. De l'absence des microbes dans les tissus végétaux. *Ann. Inst. Pasteur*, Paris, **2**, 567-570.
- FISCHER A. — 1954. Papierchromatographische und papierelektrophoretische Trennung von Indolderivaten. *Planta*, Allem., **43**, 288-314.

- FISCHER W. — 1948. Über einige Fehlerquellen bei der Prüfung von Pflanzenteilen auf das Vorkommen von Bakterien. *Archiv. Mikrobiol.*, Dtsch., **14**, 343-351.
- GALIPPE V. — 1887. Note sur la présence de micro-organismes dans les tissus végétaux. *C. R. Soc. Biol.*, Fr., **4**, 410-416 ; 557-560.
- GALIPPE V. — 1917. Parasitisme normal et microbiose. *C. R. Acad. Sci.*, Paris, **165**, 162-164.
- GALLAND. — 1904. Étude sur les mycorhizes endotrophes. *Thèse Doct. Sci. Nat.*, Paris (144 p.).
- GALSTON A.W. — 1958. Gibberellin transport as a basis for gibberellin - auxin synergism. *Plant Physiol.*, U.S.A., **32**, 34-40.
- GALSTON A.W. et WARBURG H. — 1959. An analysis of auxin-gibberellin interaction in pea stem tissue. *Plant Physiol.*, U.S.A., **34**, 16-22.
- GARDNER I.C. — 1958. Nitrogen fixation in *Elaeagnus* root nodules. *Nature*, G.-B., **181**, p. 716.
- GAUTHERET R.J. — 1959. La culture des tissus végétaux. Techniques et réalisations. *Masson et C^{ie}* (863 p. ; 986 ref.).
- GAUTHERET R.J. — 1961. Action conjuguée de l'acide gibbéréllique, de la cinétine et de l'acide indole-acétique sur les tissus cultivés *in vitro*, particulièrement sur ceux de Topinambour. *C. R. Acad. Sci.*, Paris, **253**, 1.381-1.385.
- GAUTHERET R.J. — 1964 a. La culture des tissus végétaux. Son histoire, ses tendances. *Rev. Cytol. Biol. végét.*, Fr., **27**, 99-220.
- GAUTHERET R.J. — 1964 b. Recherches sur quelques facteurs de différenciation des formations cribro-vasculaires dans les tissus de Topinambour cultivés *in vitro*. *Rev. Cytol. Biol. végét.*, **27**, 333-342.
- GEORGEVITCH P. — 1916. De la morphologie des microbes des nodules des feuilles d'une Rubiacée : *Pavetta coffea*. *C. R. Soc. Biol.*, Fr., **79**, 411-413.
- GIOELLI F. — 1940. Produzione di tumori per mezzo dei *Bacterium tumefaciens* su culture *in vitro* di tessuti vegetali. *Nuovo G. Bot. Ital.*, **47**, 452-453.
- GORDON S.A. et WEBER R.P. — 1951. Colorimetric estimation of indole-acetic acid. *Plant Physiol.*, U.S.A., **26**, 192-195.
- GRAU F.H. et WILSON P.W. — 1961. Cell free nitrogen Fixation by *Bacillus polymyxa*. *Bacteriol. Proc.*, U.S.A., **61**, p. 193.
- GRIEVE B.J. — 1939. Epinastic response induced in plants by *Bacterium solanacearum*. *Ann. Bot.*, G.-B., **11**, 587-600.
- GUILLIERMOND A. — 1919. Mitochondries et Symbiotes. *C. R. Soc. Biol.*, Fr., **82**, 309-312.
- GUILLIERMOND A., MANGENOT G. et PLANTEFOL L. — 1933. Traité de cytologie végétale. Ed. E. le François, Paris (1.195 p.).
- GUTHRIE J.D. — 1931. The effect of various chemical treatment of dormant potato tubers on the peroxidase, catalase, pH and reducing properties of the expressed juice. *Contrib. Boyce Thompson Inst.*, **3**, 499-507.
- GUTHRIE J.D. — 1938. Inhibition of the growth of buds of potato tubers with the vapors of the methyl ester of naphthalene-acetic acid. *Contrib. Boyce Thompson Inst.*, **10**, 325-328.
- GUTHRIE J.D. — 1940. Role of glutathion in the breaking of the rest period of buds by ethylene chlorhydrine. *Contrib. Boyce Thompson Inst.*, **11**, 261-270.
- GUYENOT E. — 1917. Recherches expérimentales sur la vie aseptique et le développement d'un organisme en fonction du milieu. *Bull. Biol. Fr.-Belgique*, **51**, 1-135.
- HAMILTON P.B. et WILSON P.W. — 1955. in « Biochemistry of Nitrogen ». p. 139. *Suomalainen Tiedekatemia Helsinki*.
- HAYASHI F., BLUMENTHAL-GOLDSCHMIDT et RAPPAPORT L. — 1962. Acid and neutral gibberellin like substance in potato tubers. *Plant Physiol.*, U.S.A., **37**, 774-780.
- HEMBERG T. — 1948. Studies of auxins and growth inhibiting substances in the potato tubers and their significance with regard to its rest period. *Acta Horti. Bergiani*, Suède, **14**, 134-216.
- HEMBERG T. — 1949. Significance of growth inhibiting substances and auxins for the rest period the potato tuber. *Physiol. Plant*, Danem., **2**, 21-36.

- HEMBERG T. — 1954. Studies on the occurrence of free and bound auxins and of growth inhibiting substances in the potato tuber. *Physiol. Plant*, Danem., **7**, 312-336.
- HENDERSON J.H.M. — 1954. The changing nutritional pattern from normal to habituated sunflower callus tissue *in vitro*. *Ann. Biol.*, **30**, 329-348 (publication de l'U.I.S.B.).
- HENNING K. et VILLFORTH F. — 1940. Experimentelle untersuchungen zur Frage der Bakterio symbiose in hoeleren Pflanzen und ihre Beiflussung durch Leitelemente. *Biochem. Z.*, Dtsch., **305**, 299-309.
- HILTNER. — 1898. Über Entstehung und physiologische Bedeutung der Wurzelknöllchen. Die Wurzelknöllchen der Erlen und Elaeagnaceen. *Naturwiss. Z.*, Dtsch., **7**, 415-423.
- HILTNER L. — 1904. Über neuere Erfahrungen und Probleme auf dem Gebiet der Boden bakteriologie und unter besonderer Berücksichtigung der Grundungung und Brache. *Arb. dtsch. landw. Ges.*, **98**, 59-78.
- HINO S. et WILSON P.W. — 1958. Nitrogen fixation by a facultative *Bacillus*. *J. Bacteriol.*, U.S.A., **75**, 403-410.
- HOCQUETTE M. — 1929. Les réactions parasitaires des cellules d'*Alnus glutinosa* infectées par des bactéroïdes. *C. R. Soc. Biol. Lille*, **89**, 1.149-1.150.
- HOCQUETTE M. et HOCQUETTE H. — 1948. Bourgeonnement nucléolaire dans les noyaux quiescents de l'axe hypocotylé de *Cucurbita Pepo*. *Bull. Soc. Bot. Fr.*, **45**, 55-60.
- HOCQUETTE M. et PRUDHOMME V. — 1952 a. Le noyau quiescent dans l'axe hypocotylé de *Phaseolus vulgaris* L. *C. R. Acad. Sci.*, Paris, **234**, 1.303-1.305.
- HOCQUETTE M. et PRUDHOMME V. — 1952 b. Structure nucléaire dans l'axe hypocotylé de *Phaseolus vulgaris* L. pendant le jeûne glucidique et au cours des diverses étapes de la régénération cellulaire. *C. R. Acad. Sci.*, Paris, **234**, 1.472-1.474.
- HOCQUETTE M. et BUSTRAEN G. — 1953. L'azote et ses variations quantitatives dans les axes hypocotylés de *Phaseolus* au cours du jeûne et de la régénération cellulaire par nutrition glucidique. *Bull. Soc. Bot. Nord Fr.*, **6**, 55-57.
- HOCQUETTE M. et MONTUELLE B. — 1955. Participation des glucides de la membrane au métabolisme cellulaire dans les axes hypocotylés de *Phaseolus vulgaris*. *C. R. Acad. Sci.*, Paris, **240**, 1.567-1.568.
- HOCQUETTE M., MONTUELLE B. et POIX M. — 1962. Le noyau quiescent de la betterave à sucre et la synthèse protidique. *C. R. Acad. Sci.*, Paris, **255**, 2.499-2.500.
- HOCQUETTE M. et MONTUELLE B. — 1963. Vie de fragments d'organes végétaux en atmosphère d'azote. *Bull. Soc. Bot. Nord Fr.*, **16**, 245-246.
- HOLLIS J.P. — 1951. Bacteria in healthy potato tissue. *Phytopathol.*, U.S.A., **41**, 350-366.
- JANSE J.M. — 1897. Les endophytes radicaux de quelques plantes javanaises. *Ann. Jard. bot. Buitenzorg*, **14**, 53-201.
- JAVELLY E. — 1914. Les corps bactéroïdes de la Blatte (*Periplaneta orientalis*) n'ont pas encore été cultivés. *C. R. Soc. Biol.*, **77**, 413-414.
- JENSEN V. — 1950. Nitrogen fixation by strains of *Aerobacter aerogenes*. *Physiol. Plant*, Danem., **9**, 130-136.
- JOHANNSEN W. — 1900. Das Aether-Verfahren beim Frühreiben mit besonderer Berücksichtigung der Fließertreiberei. *Ed. Fischer*, Iéna (28 p.).
- JOHNSON G. et SCHAAL-SERMER L.A. — 1952. Relation of chlorogenic acid to scab resistance in potatoes. *Science*, U.S.A., **115**, 627-629.
- JOLIVET E. — 1959. Variations des acides citrique, malique, succinique et fumarique dans le tubercule de pomme de terre sous l'influence du traitement à la rindite. *C. R. Acad. Sci.*, Paris, **249**, 2.226-2.227.
- JORISSEN A. — 1884. Les propriétés réductrices des graines et la formation de la diastase. *Bull. Acad. r. Sci., Belg.*, 3^e série, **8**, 350-355.
- KANDLER O. — 1951. Über den Einfluss von Boden - bakterien und deren Filtraten auf das Wachstum *in vitro* kultivierter Wurzeln. *Arch. Mikrobiol.*, **15**, 430-438.
- KARDOS J. — 1964. Comparative studies on *Datura stramonium* and its symbiotic microorganisms. *Acta. biol. Acad. Sci. hung.*, **14**, 285-292.

- KARTASHOVA N.N. — 1957. (en russe). Propriétés antibiotiques du nectar et des nectaires de certaines plantes. *Z. obsheh. Biol.*, S.S.S.R., **18**, 235-241.
- KATAOKA T. — 1930. On the significance of the root-nodules of *Coriaria japonica* in the nitrogen nutrition of the plant. *Jap. J. Bot.*, **5**, 209-218.
- KATO J. — 1958. Studies on the physiological effect of gibberellin. II). On the interaction of gibberellins with auxins and growth inhibitors. *Physiol. Pl.*, Danem., **11**, 10-15.
- KATZNELSON H. et SIROIS J.C. — 1961. Auxin production by species of *Arthrobacter*. *Nature*, G.-B., **191**, 1.323-1.324.
- KATZNELSON H., SIROIS J.C. et COLES S.E. — 1962. Production of a gibberellin-like substance by *Arthrobacter globiformis*. *Nature*, G.-B., **196**, 1.012-1.013.
- KEFFORD N.P., BROCKWELL J. et ZWAR J.A. — 1960. The symbiotic synthesis of auxin by legumins and nodule bacteria and its role in nodule development. *Austral. J. Biol. Sci.*, **13**, 456-467.
- KELLERMAN K.F. — 1911. Nitrogen-gathering plants. *Yearb. U.S. Dept. Agricult.*, 213-218.
- KLEBS. — 1911. Ueber die Rhythmic in der Entwicklung der Pflanzen. *Sitzungsb. Heidelb. Akad. Wiss. Naturw.*, **23**, p. 81.
- KRASSILNIKOV N.A. — 1962. The role of microorganisms in plant-life. 283-290. In reports VIIIth Congrès International de Microbiologie. Montréal. University of Toronto Press.
- KRONBERGER M. — 1949. Versuche zum Impfproblem von Nichtleguminosen. *Landw. Jb. Bayern*, **26**, 17-41.
- KULESCHA Z. et GAUTHERET R.J. — 1948. Sur l'élaboration de substances de croissance par trois types de cultures de tissus de Scorsonère: cultures normales, cultures de crown-gall et cultures accoutumées à l'hétéroauxine. *C. R. Acad. Sci., Fr.*, **227**, 292-294.
- KULESCHA Z. et GAUTHERET R.J. — 1949. Recherche sur l'action du tryptophane sur la prolifération des cultures de tissus de quelques végétaux. *C. R. Soc. Biol.*, **143**, 460-463.
- KULESCHA Z. — 1951. Recherches sur l'élaboration de substances de croissance par les tissus végétaux. *Thèse Doct. Sci. nat.* Paris (114 p.) et *Rev. Gén. Bot.*, Fr., **59**, 92-111 ; 127-157 ; 195-208 et 241-264.
- LAGARDE J. — 1959. Influences comparées de l'éthylène chlorhydrine et de la gibbéréline sur l'évolution des germes de pomme de terre (var. Bintje). *C. R. Acad. Sci., Fr.*, **248**, 582-585.
- LAGRANGE E. — 1954. L'action bactéricide de l'extrait de feuilles de Noyer : *Juglans regia* L. *C. R. Soc. Biol., Fr.*, **148**, 2.097-2.098.
- LAGRANGE E. — 1956. L'action antibiotique de *Juglans regia* L. *C. R. Soc. Biol., Fr.*, **150**, 613-615.
- LAGUESSE E. — 1919. Mitochondries et Symbiotes. *C. R. Soc. Biol., Fr.*, **82**, 337-339.
- LAMBIN S. et GERMAN A. — 1961. Précis de microbiologie. *Ed. Masson et C^{ie}* (458 p.).
- LAMOTTE J. — 1957. Initiation aux méthodes statistiques en biologie. *Ed. Masson et C^{ie}* (144 p.).
- LASSEUR PH., DUPAIX A. et MAGUITOT C. — 1931. Application du phénomène de Boutaric à la préparation des solutions colorantes. *Trav. Lab. Microbiol. Fac. Pharmac.*, Nancy, 121-132.
- LAURENT E. — 1885. Sur la prétendue origine bactérienne de la diastase. *Bull. Acad. r. Belg.*, **10**, 38-57.
- LAURENT E. — 1890. Expériences sur l'absence de bactéries dans les vaisseaux des plantes. *Bull. Acad. r. Belg.*, **19**, 468-471.
- LEFEVRE J. — 1939. Observation sur la teneur de divers organes végétaux en acide indol-3-acétique. *C. R. Soc. Biol., Fr.*, **130**, 225-227.
- LINK G.K.K. — 1937. Role of heteroauxines in legume nodule formation, beneficial host effects of nodules and soil fertility. *Nature*, G.-B., **140**, p. 507.
- LINK G.K.K. et EGGER V. — 1940. *Avena* coleoptile assay of ether extracts of nodule and roots of bean, soybean and pea. *Bot. Gaz.*, U.S.A., **101**, 650-657.
- LINSER H. et KIEMAYER O. — 1957. Methoden zur Bestimmung pflanzlichen Wuchsstoffe. *Springer Verlag*, Wien.

- LIOUZOU A. — 1957. Initiation pratique à la statistique. *Ed. Gauthier-Villars, Paris* (213 p.).
- LIPMANN C.B. et TAYLOR J.K. — 1922. Proof of the power of the wheat plant to fix atmospheric nitrogen. *Science, U.S.A.*, **56**, 605-606.
- LOCKE S.B., RIKER A.J. et DUGGAR B.M. — 1939. Production of growth substance on peptone broth by crown - gall bacteria and related on gall-forming organisms. *J. Agric. Research*, **59**, 519-525.
- LOMINSKY O. — 1890. Über den parasitismus einiger pathogener Mikroben auf lebenden Pflanzen. *Centrabl. Bakteriol., Dtsch.*, **8**, 325-329.
- LONA F. — 1956. L'acido gibberellico determina la germinazione dei semi di *Lactuca scariola* in fase di scoto-inibizione. *Ateneo Parmense*, **27**, 641-644.
- LUCAS E.H. et LEWIS R.W. — 1944. Antibacterial substances in organs of higher plants. *Science, U.S.A.*, **100**, 597-599.
- LUMIERE A. — 1919. Le mythe des Symbiotes. *Ed. Masson et C^{ie} Paris*, (210 p.).
- LUTMAN B.F. et WHEELER H.E. — 1948. *Bacillus megaterium* De Bary from the interior of healthy potato tubers. *J. Wash. Acad. Sci.*, **38**, 338-340.
- MAC BURNEY C.H., BOLLEN N.B. et WILLIAMS R.J. — 1935. Panthotenic acid and the nodule bacteria-legume symbiosis. *Proc. Nat. Acad. Sci., U.S.A.*, **21**, 301-304.
- MACLEOD A.M. et MILLAR A.S. — 1962. Effect of gibberellic acid on barley endosperm. *J. Inst. Brewing, G.-B.*, **68**, 322-332.
- MADEC P. — 1963. Les développements les plus récents dans le domaine de la physiologie de la pomme de terre. Comptes rendus II^e conférence (Pise). *Assoc. for potato research*, 31-59 (187 Réf.).
- MAGROU J. — 1918. L'immunité dans la symbiose. *Ann. Inst. Pasteur, Paris*, **32**, 37-46.
- MAGROU J. — 1920. Immunité des plantes annuelles vis à vis des champignons symbiotiques. *C. R. Acad. Sci., Paris*, **170**, 616-618.
- MAGROU J. — 1939. Concentration moléculaire et tubérisation chez la pomme de terre. *C. R. Soc. Biol., Paris*, **130**, 1.163-1.166.
- MAGROU J. — 1941. Remarques sur la biologie de la pomme de terre. *Ann. Inst. Pasteur, Paris*, **66**, 249-283.
- MAGROU J. — 1943. Des Orchidées à la pomme de terre. Essai sur la symbiose. Coll. : l'avenir de la Science n° 18. *Ed. Gallimard, Paris* (203 p.).
- MAIGE A. — 1923 a. États d'équilibre du noyau pendant la digestion de l'amidon dans les cellules de pomme de terre. *C. R. Soc. Biol., Lille*, **89**, 556-558.
- MAIGE A. — 1923 b. Variations du noyau pendant la digestion de l'amidon à diverses températures chez le haricot. *C. R. Soc. Biol., Lille*, **89**, 1.149-1.150.
- MALVESIN-FABRE G. et EYME J. — 1950. Le noyau des cellules à mycorhizes chez *Limodorum abortivum* et son amitose. *Rev. Gén. Bot., Fr.*, **57**, 92-96.
- MARCANO V. — 1882 a. Fermentation de la fécule. Présence d'un vibrion dans la graine de maïs qui germe et dans la tige de cette plante. *C. R. Acad. Sci., Fr.*, **95**, 345-347.
- MARCANO V. — 1882 b. Fermentation directe de la fécule. Mécanisme de cette métamorphose. *C. R. Acad. Sci., Fr.*, **95**, 856-859.
- MARCUS O. — 1942. Über das Vorkommen von micro-organismen in pflanzlichen Geweben. *Archiv. Mikrobiol., Dtsch.*, **13**, 1-44.
- MARIAT F. — 1951. Contribution à l'étude de la symbiose dans ses rapports avec les facteurs de croissance. *Thèse Sci. Doct. Univ. Paris*.
- MARIAT F. — 1952. Recherches sur la physiologie des embryons d'Orchidées. *Rev. Gén. Bot., Fr.*, **59**, 324-377.
- MCCOMB A.J. et CARR D.J. — 1958. Evidence from a dwarf pea bioassay for naturally occurring gibberellins in the growth plant. *Nature, G.-B.*, **181**, 1.548-1.549.
- MERCIER L. — 1907. Recherches sur les Bactéroïdes des Blattes. *Archiv. Protistenk., Dtsch.*, **9**, 346-358.

- METCHNIKOFF O. — 1901. Note sur l'influence des microbes sur le développement des têtards. *Ann. Inst. Pasteur, Paris*, **15**, 630-634.
- MEYER J. — 1950. Gigantisme nucléolaire et cécidogénèse. *C. R. Acad. Sci., Paris*, **231**, 1.333-1.335.
- MIEHE H. — 1914. Weitere Untersuchungen über die Bakterien-symbiose bei *Ardisia crispa*.
1° Die Mikroorganismen. *Jahrb. wiss. Bot.*, **53**, 1-53.
2° Die Pflanzen ohne Bakterien. *Ibid*, **56**, 28-60.
- MILOVIDOV P.F. — 1918 a. Sur la question de la double coloration des bactéries et des chondriosomes. *C. R. Soc. Biol., Paris*, **98**, 555-558.
- MILOVIDOV P.F. — 1928 b. Méthodes permettant la différenciation histologique des Bactéries symbiotes et des chondriosomes. *Bull. Hist. Appl. Physiol., Paris*, **5**, 381-391.
- MITCHELL L.C. — 1958. Acide gibbérellique et son sel de potassium. Une courte étude sur papier chromatographique. *J. Assoc. offic. Agric. Chem., U.S.A.*, **41**, 182-185.
- MOLISCH H. — 1909. Warmbad und Pflanzentreiberei. *Osterr. Garten. Z.*, **4**, 17-23 et 50-59.
- MOLLIARD M. — 1915. Production expérimentale de tubercules aux dépens de la tige principale chez la pomme de terre. *C. R. Acad. Sci., Paris*, **161**, 531-533.
- MOLLIARD M. — 1939. Nouvelles recherches sur la production de tubercules chez la pomme de terre en milieu aseptique. *C. R. Acad. Sci., Paris*, **208**, 1.257-1.259.
- MONTUELLE B. — 1954. Variation du degré de polymérisation de la cellulose chez trois Monocotylédones. *C. R. Acad. Sci., Paris*, **239**, 992-993.
- MONTUELLE B. — 1955. Variations du degré de polymérisation moyen de la cellulose au cours de la croissance du *Linum Usitatissimum*. *C. R. 80^e Congr. nation. Soc. Sav. Lille, Sect. Sci. Ed. Gauthier-Villars, Paris*, 205-211.
- MONTUELLE B. — 1957. Présence de bactéries dans les embryons de *Phaseolus vulgaris*. *Bull. Soc. Bot. Nord Fr.*, **10**, 137-139.
- MONTUELLE B. — 1959. Présence de bactéries dans les tubercules de pomme de terre. *Bull. Soc. Bot. Nord Fr.*, **12**, 140-144.
- MONTUELLE B. — 1960. Présence de Bactéries dans la carotte. *Bull. Soc. Bot. Nord Fr.*, **13**, 13-15.
- MONTUELLE B. — 1961. Localisation cytotologique des bactéries présentes dans les tubercules de pomme de terre. *C. R. Acad. Sci., Paris*, **252**, 452-454.
- MONTUELLE B. — 1961. Mise en évidence cytotologique de bactéries dans les racines de betterave. *C. R. Acad. Sci., Paris*, **252**, 2.950-2.952.
- MONTUELLE B. — 1961. Influence de la levée artificielle de la dormance du tubercule de pomme de terre sur le développement des bactéries dans les tissus. *C. R. Acad. Sci., Paris*, **252**, 3.341-3.342.
- MONTUELLE B. — 1962. Recherches cytotologiques et bactériologiques sur la maladie des tâches rouilles de la pomme de terre. *Bull. Soc. Bot. Nord Fr.*, **15**, 37-40.
- MONTUELLE B. — 1962. Les bactéries dans les organes souterrains de la pomme de terre au cours de son cycle végétatif. *C. R. Acad. Sci., Paris*, **254**, 4.220-4.221.
- MONTUELLE B. et BEERENS H. — 1962. Action de la kanamycine sur la germination des tubercules de pomme de terre. *C. R. Acad. Sci., Paris*, **255**, 353-354.
- MONTUELLE B. — 1962. Les gibbérellines. *Bull. Soc. Bot. Nord Fr.*, **15**, 73-90.
- MONTUELLE B. — 1962. Modifications caryologiques dans les tissus de pomme de terre atteints de la maladie des taches de rouille. *Bull. Soc. Bot. Nord Fr.*, **15**, 113-116.
- MONTUELLE B. — 1963. Production d'acide indole-acétique par des bactéries. *Bull. Soc. Bot. Nord Fr.*, **16**, 13-15.
- MONTUELLE B. et POIX R. — 1963. Utilisation de l'azote gazeux par les racines de betterave. Expériences avec l'azote 15. *Bull. Soc. Bot. Nord Fr.*, **16**, 21-22.
- MONTUELLE B. et BLONDEAU R. — 1963. Rapports entre le bourgeonnement des tubercules de pomme de terre et la multiplications des bactéries qu'ils hébergent. *Bull. Soc. Bot. Nord Fr.*, **16**, 199-202.

- MONTUELLE B. et CHEMINAIS L. — 1964. Synthèse de substances du groupe des gibbérellines par des bactéries. *C. R. Acad. Sci., Paris*, **258**, 6.016-6.017.
- MONTUELLE B. et CORNETTE J. — 1964. Influence des conditions de conservation sur l'évolution des substances auxiniques des tubercules de pomme de terre. *Europ. Potato J.* **7**, 161-171.
- MORTENSON L.E. — 1962. Inorganic Nitrogen Assimilation and Ammonia incorporation. Chap. III in «The Bacteria». Ed. by Gonsalus et Stanier. *Academic Press.*, New-York and London.
- NEMEC B. — 1932. Über Bakteriensymbiose bei *Ardisia crispa*. *Mém. Soc. roy., Bohême*, **19**, 1-23.
- NESTLER A. — 1899. Ueber das Vorkommen von Pilzen in Wach-hoderbeeren. *Ber. deutsch. bot. Gesellsch.*, **17**, 320-325.
- NESTLER A. — 1922. Einige Beobachtungen an der Paprikafrucht. *Ber. deutsch. bot. Gesellsch.*, **39**, 230-234.
- NIETHAMMER A. — 1943. Hefen sawie mikroskopische Pilze aus Blüten ferner von samen und Fruchten. *Arch. Mikrobiol.*, Dtsch., **13**, 45-49.
- NITSCH J.P. — 1956. Methods for the investigation of natural auxins and growth inhibitors. The Chemistry and mode of action of plant growth substances. Ed. Wain Wightman. *Proc. Symp. Wie College*, **3**, 31.
- NITSCH J.P. et NITSCH C. — 1956. Studies on the growth of coleoptile and first internode sections, a new, sensitive, straight-growth test for auxins. *Plant Physiol.*, U.S.A., **31**, 91-111.
- NOBECOURT P. — 1927. Contribution à l'étude de l'immunité chez les végétaux. *Thèse Doct. Sci. nat.*, Lyon (174 p.).
- NORRIS J.R. — 1957. A bacteriolytic Principle Associated with Cultures of *Bacillus cereus*. *J. Gen. Microbiol.*, **16**, 1-8.
- NUTTALL G. et THIERFELDER H. — 1895. Thierisches Leben ohne Bakterien im Verdauungskanal. *Z. Physiol. Chemie*, **21**, 109-121.
- NYSTERAKIS F. — 1961. Formation de plantules au sein des tissus de tomates cultivés *in vitro*. *C. R. Acad. Sci., Paris*, **253**, 1.006-1.008.
- NYSTERAKIS F. — 1962. Sous conditions aseptiques, les graines de tomates mûres donnent également des plantules au sein des tissus de fruits mûrs. *C. R. Acad. Sci., Paris*, **255**, 1.004-1.006.
- NYSTERAKIS F. — 1963. Au cours de la plupart de nos investigations, faut-il ou non tenir compte des enseignements de Pasteur ? *C. R. Acad. Sci., Paris*, **256**, 762-764.
- ODNOFF C. — 1963. The effect of gibberellin and phenyl-boric acid on xylem differentiation and epidermal cell elongation in Bean roots. *Physiol. Plant.*, Danem., **16**, 474-483.
- OKAZAWA Y. — 1959. Studies on the occurrence of natural gibberellin and its effect on the tuber formation of potato plant. *Proc. Crop. Sci. Soc. Jap.*, **28**, 129-133.
- ORR M.Y. — 1923. The leaf glands of *Dioscorea macroura*, Harms. *Notes roy. Bot. Garden, Edinburgh*, **14**, 57-72.
- OSBORN E.M. — 1943. On the occurrence of antibacterial substances in green plant. *Brit. J. Exper. Pathol.*, **24**, 227-231.
- PALEG L. — 1961. Physiological effects of gibberellic acid. III) Observations on its mode of action on barley endosperm. *Plant Physiol.*, U.S.A., **36**, 829-837.
- PANOSSIAN A.K., ARUTUNIAN R.S. et MARSHAVINA Z.N. — 1963. (en russe). L'effet des métabolites du sol sur la croissance et le développement des plantes. *Z. allg. Mikrobiol.*, Dtsch., **3**, 42-46.
- PASTEUR L. — 1872. Nouvelles expériences pour démontrer que le germe de la levure qui fait le vin provient de l'extérieur des grains de raisin. *C. R. Acad. Sci., Paris*, **75**, 781-782.
- PASTEUR L. — 1885. Observations relatives à la note précédente de E. DUCLAUX. *C. R. Acad. Sci., Paris*, **100**, p. 68.
- PATE J.S. — 1958. Studies of the growth substances of legumes nodules using paper chromatography. *Austral. J. Biol. Sci.*, **11**, 316-328.

- PAVILLARD J. — 1949. Sur l'évolution des substances de croissance au cours du développement de tubercules de pomme de terre sains et atteints de dégénérescence. *Rev. Gén. Bot., Fr.*, **56**, 541-564.
- PEAUD-LENOEL C. et DE GOURNAY-MARGERIE C. — 1962. Some effects of chloramphenicol on isolated wheat roots. *Phytochemistry, G.-B.*, **1**, 267-275.
- PERLO J. — 1910. Die pflanzlichen Aktinomykesen (Ein Beitrag zur Physiologie der pathogenen Mikroorganismen). *Zbl. Bakteriol., Dtsch.*, **27**, 451-579.
- PEROTTI R. — 1926. Les limites de l'enquête biologique en pédologie. *Proc. Intern. Soc. Soil Sci.*, **2**, 146-169.
- PEROTTI R. — 1919. Sulla presenza di una specie batterica nelle radici della *Diplotaxis erucoides* (D.C.). *Atti Accad. nazion. Lincei, R. C., Cl. Sci., Ital.*, **28**, 331-335.
- PEROTTI R. — 1920. Ulteriori ricerche sui bacilli radicali della *Diplotaxis erucoides* (D.C.). *Atti Accad. nazion. Lincei, R. C., Cl. Sci., Ital.*, **29**, 361-364.
- PEROTTI R. et CORTINI-COMMANDUCCI J. — 1922. Normale presenza di batteri nelle radici di numerose fanerogame. *Atti Accad. nazion. Lincei, R. C., Cl. Sci., Ital.*, **31**, 484-487.
- PHILIPSON M.N. et BLAIR I.D. — 1957. Bacteria in clover root tissue. *Canad. J. Microbiol.*, **3**, 125-129.
- PHILIPSON W.R. et SHEAT D.E.G. — 1963. Induction of callus on decapitated hypocotyls of *Helianthus* by *Escherichia coli* and other bacteria. *Nature, G.-B.*, **197**, 204-205.
- PHINNEY B.O. — 1961. Dwarfing genes in *Zea mays* and their relation to the gibberellin. *IVth intern. Conf. Plant Growth Regulation*. Iowa State, 489-499.
- PIERANTONI U. — 1914. La luce degli Insetti luminosi et la simbiosi ereditaria. *R. C. Accad. Sci. Napoli*, **53**, 15-21.
- PIERANTONI U. — 1918. Gli organi simbiotici e la luminescenza batterica dei Cefalopodi. *Publ. Staz. Zool. Napoli*, **1**, 106-146.
- PIERANTONI U. — 1919. Le simbiosi fisiologiche e le attività dei plasmi cellulari. *Riv. Biol., Ital.*, **1**, 213-221.
- PILET P.E. — 1957. Dosage photolorimétrique de l'acide indol-acétique. Application à l'étude des auxines-oxydases. *Rev. Gén. Bot., Fr.*, **64**, 106-122.
- PILET P.E. — 1961. Les Phytohormones de croissance. *Ed. Masson et C^{ie}* (774 p.).
- PILET P.E. et MARGOT L. — 1953. Auxines et amidon.
I) Distribution de l'amidon radiculaire (*Lens culinaris*). *Bull. Soc. Vaud. Sci. Nat.*, **65**, 47-59.
- PILET P.E. et WURGLER W. — Auxines et amidon.
II) Variations de l'amidon et inversion géotropique à la suite de traitements auxiniques. *Bull. Soc. Vaud. Sci. Nat.*, **65**, 397-401.
- PILET P.E. et TURIAN G. — 1953. Auxines et amidon.
III) Étude in vitro de l'action des auxines sur l'amylolyse. *Bull. Soc. Vaud. Sci. Nat.*, **65**, 403-408.
- POCHON J. et DE BARIAC H. — 1958. Interactions entre la croissance des *Azotobacter* et celle du maïs. *Ann. Inst. Pasteur, Paris*, **94**, 419-247.
- PORTIER P. — 1911. Recherches physiologiques sur les champignons entomophytes. *Thèse Doct. Sc. Nat.*, Paris, (47 p.).
- PORTIER P. — 1918. Les Symbiotes. *Ed. Masson et C^{ie}* (310 p.).
- PREVOT A.R. — 1961. Traité de Systématique bactérienne. *Ed. Dunod*, Paris, 2 tomes (471 et 770 p.).
- PROCTOR M.H. et WILSON P.W. — 1958. Nitrogen fixation by Gram negative Bacteria. *Nature, G.-B.*, **182**, p. 891.
- QUETEL R. — 1938. Influence du forçage sur le métabolisme de l'azote, des sucres et du phosphore. *Thèse Doct. Sc. Nat.*, Paris (230 p.).
- RADLEY M. — 1958. The distribution of substances similar to gibberellic acid in higher plants. *Ann. Bot., G.-B.*, **22**, 297-307.

- RAPPAPORT L., LIPPERT L.F. et TIMM H. — 1957. Sprouting, plant growth and tuber production as affected by chemical treatment of white potato seed pieces. I) Breaking the rest period with gibberellic acid. *Amer. Potato J.*, **34**, 254-260.
- RAPPAPORT L. et SMITH O.E. — 1962. Gibberellins in the rest period of the potato tuber. Eigenschaften und Wirkungen der Gibberelline, 37-45. *Springer Verlag*, Berlin, Göttingen-Heidelberg.
- RASHBA O.J. et collab. — 1954. Caractéristiques biochimiques des substances antibactériennes de certaines Labiées. *Mikrobiol. Zh.*, S.S.S.R., **16**, 62-66.
- RAZNIZINA E.A. — 1938. (en russe). Formation de substances de croissance, type auxine, par les bactéries. *Dokl. Akad. Nauk. S.S.S.R.*, **18**, 353-355.
- REGAUD C. — 1919. Mitochondries et Symbiotes. *C. R. Soc. Biol.*, Fr., **82**, 241-251.
- RICHMOND M.H. — 1957. Bacteriol Lysozyme. *J. Gen. Microbiol.*, G.-B., (Proc. Soc. Gen. microbiol.), **16**, p. IV.
- RIPPEL K. — 1910. Zur Frage des Vorkommen von Mikro-organismen in gesunden pflanzlichen Geweben. *Planta*, Allem., **30**, 806-811.
- RIPPEL K. — 1941. Nochmals zur Frage des Vorkommen von Mikro-organismen in gesunden pflanzlichen Geweben. *Planta*, Allem., **32**, 391-394.
- RIVIERE J. — 1963. Action des microorganismes de la rhizosphère sur la croissance du blé. II) Isolement et caractérisation des bactéries produisant des phytohormones. *Ann. Inst. Pasteur*, Paris, **105**, 303-314.
- ROBERTS J.L. et ROBERTS E. — 1939. Auxin production by soil microorganisms. *Soil Sci.*, U.S.A., **48**, 135-139.
- ROMWALTER A. et KIRALY A. — 1939. Hefearten und Bakterien in Früchten. *Archiv. Mikrobiol.*, Dtsch., **10**, 87-91.
- RUBEN S., HASSID W.Z. et KAMEN M.D. — 1940. Radio activ nitrogen in the study of N₂ fixation by non leguminous plants. *Science*, U.S.A., **91**, 578-579.
- RUHLAND W. et coll. — 1961. Encyclopedia of plant physiology. *Springer-Verlag*, Berlin, Göttingen, Heidelberg.
- RUSSEL H.L. — 1894 Bacteria in their relation to vegetable tissues. *Johns Hopkins Hosp. Reports.*, **3**, 224-263.
- SABET Y.S. — 1946. Bacterial root nodules in the Zygothylaceae. *Nature*, G.-B., **157**, p. 656.
- SALTON M.R.J. — 1958. The Lysis of Micro-organisms by Lysozyme and related Enzymes. *J. Gen. Microbiol.*, G.-B., **18**, 481-490.
- SAMISH Z., DIMANT D. et MARANI T. — 1957. Hollowness in cucumber pickles. *Food manuf.*, G.-B., **32**, 501-505.
- SAMISH Z. et DIMANT D. — 1959. Bacterial population in fresh healthy cucumbers. *Food manuf.*, G.-B., **34**, 17-20.
- SAMISH Z., ETINGER-TULCZYNSKA R. et BICK M. — 1961. Microflora within healthy tomatoes. *Appl. Microbiol.*, U.S.A., **9**, 20-25.
- SANFORD G.B. — 1948. The occurrence of bacteria in normal potato plants and legumes. *Scientif. Agric.*, Canada, **28**, 21-25.
- SCHANDERL H. — 1939. Über die Bacteriensymbiose bei Leguminosen und Nichtleguminosen. *Gartenbauwiss.*, **13**, 406-440.
- SCHANDREL H. — 1942. Vergleichende Untersuchungen über den Stickstoffhaus halt von Leguminosen und Nichtleguminosen. *Dtsch. Bot. Ges.*, **60**, 86-93.
- SCHANDERL H. — 1947. Botanische Bakteriologie und Stick stoffhaushalt der Pflanzen auf neuer Grundlage. *Ed. Ulmer Stuttgart* - Ludwisburg (198 p.).
- SCHANDERL H. — 1953. Methoden zur Ausiosungspontaner Bacterienentwicklung in normalen Pflanzengeweben. *Ber. Dtsch. Bot. Gesellsch.*, **66**, 79-86.
- SCHANDERL H. — 1962 a. Der derzeitige Stand in der Frage der Isolierbarkeit von Bakterien aus normalen, gesunden Pflanzengeweben. *Zentr. Bakteriol.*, Dtsch., **184**, 287-289.

- SCHANDERL H. — 1962 b. Verbesserte Methoden für den Nachweis der Entwicklung von Bakterien aus aseptisch entnommenen normalen, gesunden Pflanzengeweben. *Jahresb. der Hess. Lehr- und Forschungsanstalt für Wein-Obst und Gartenbau*, Geisenheim., 15-18.
- SCHANDERL H. — 1963. Isolierbarkeit von Bakterien aus normalen Kartoffelknollengewebe. *Der Kartoffelbau*, **14**, p. 1.
- SCHMIDT E.L. — 1951. Soil microorganisms and plant growth substances. 1) Historical. *Soil Science*, **71**, 129-160.
- SMALJI V.T. et BERSHOVA O.I. — 1957. (en russe). Formation d'hétéroauxine dans les cultures d'*Azotobacter*. *Microbiologija*, S.S.S.R., **26**, 526-532.
- SMALLI V.T. — 1958. (en russe). Formation d'hétéroauxine dans les cultures de bactéries de la rhizosphère du blé. *Mikrobiol. Ukr. Z.*, **20**, 5-8.
- SMITH M.A. et NIVEN C.F. — 1957. The occurrence of *Leuconostoc mesenteroides* in potato tubers and garlic cloves. *Appl. microbiol.*, U.S.A., **53**, 154-155.
- SMITH O.E. et RAPPAPORT L. — 1960. Content of endogenous gibberellins in resting and sprouting tubers of potato, *Solanum tuberosum*. *Plant Physiol.*, U.S.A., **35**, 34-35.
- SPRATT. — 1911. Some observation on the Life-history of *Anabaena Cycadeæ*. *Ann. Bot. G.-B.*, **25**, 369-380.
- STEINBERG R.A. — 1947. Growth responses of tobacco seedlings in aseptic culture to diffusates of some common soil bacteria. *J. Agric. Res.*, U.S.A., **75**, 199-206.
- STEYAERT R.L. — 1932. Une épiphytie bactérienne des racines de *Coffea robusta* et *C. klainii*. *Rev. Zool. Bot. afr.*, **22**, 133-139.
- STOLP H. — 1952. Beiträge zur Frage der Beziehungen zwischen Mikroorganismen und höheren Pflanzen. *Archiv. Mikrobiol.*, Dtsch., **17**, 1-29.
- STOWE B.B. — 1955. The production of indol-acetic acid by bacteria. *Biochem. J.*, G.-B., **61**, 9-10.
- STOWE B. et YAMAKI T. — 1957. The history and physiological action gibberellins. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, **8**, 181-216.
- STRANGE R.E. et DARK F.A. — 1957. A cell-wall Lytic Enzyme Associated with spores of *Bacillus species*. *J. Gen. Microbiol.*, G.-B., **16**, 236-249.
- STRANGE R.E. et DARK F.A. — 1957. Cell-wall Lytic Enzymes at Sporulation and Spore Germination in *Bacillus sp.* *J. Gen. Microbiol.*, G.-B., **17**, 525-537.
- STURK A. — 1941. Neuere Erkenntnisse über die Ursache der Bombagen und der Säuerung in Gemüsekonserven. *Die Obst und Gemüse-Verwertungs.* **42**, 454-456.
- SZALAI I. — 1959 a. Quantitative distribution of free amino-acids in rindite-forced new potato tubers in various phases of sprouting. *Acta biol. Acad. Sci. hungar.*, **9**, 253-264.
- SZALAI I. — 1959 b. Quantitative changes of Growth-Promoting and Inhibiting Substances in the Potato tubers Treated with Rindite. *Physiol. Plant, Danem.*, **12**, 237-244.
- SZILVASI S. — 1942. Untersuchungen über das Vorkommen von Mikroorganismen in den lebenden Geweden der Pflanzen. Œuvre posthume publiée par von FEHER. *Mittlg. Boten. Inst. Universität in Sopron*, **7**, 1-21.
- TERVET I.W. et HOLLIS J. — 1948. Bacteria in the storage organs of healthy plant. *Phytopathol.*, U.S.A., **38**, 960-967.
- THIMANN K.V. — 1936. On the physiology of the formation of nodules on legume roots. *Proc. Nat. Acad. Sci. Wash.*, **22**, 511-514.
- THIMANN K.V. — 1939. The physiology of nodule formation. *Third Comm. Int. Soc. Soil Sci.*, Vol. A., 24-28.
- THIMANN K.V. — 1955. The life of bacteria. *Ed. The Macmillan Co.*, New-York (775 p.).
- THIMANN K.V. — 1956. L'origine et les fonctions des auxines. *Ed. C.D.U.* Paris (120 p.).
- THIMANN K.V. — 1960. Plant growth in Fundamental aspects of normal and malignant growth. *Ed. W. W. Eowinski Elsevier Publ. Comp.*, Amsterdam, 748-822.
- THIMANN K.V. et SKOOG F. — 1940. The extraction of auxin from plant tissues. *Amer. J. Bot.*, **27**, 951-960.

- THOMAS W.D. et GRAHAM R.W. — 1952. Bacteria in apparently healthy pinto beans. *Phytopathol.*, U.S.A., **42**, p. 214.
- THORNTON N.C. — 1944. Dormancy, bud growth and apical dominance regulated by oxygen in freshly-harvested potato tuber. *Contrib. Boyce Thompson Inst.*, **13**, 361-365.
- TIMM H., RAPPAPORT L. et collab. — 1960. Sprouting, plant growth and tuber production as affected by chemical treatment of white potato seed pieces.
II) Effect of temperature and time of treatment with gibb. acid. *Amer. Potato J.*, **37**, 357-365.
- TIMM H., RAPPAPORT L. et collab. — 1960. Sprouting, plant growth and tuber production as affected by chemical treatment of white potato seed pieces.
III) Compatibility of G.A. with chemicals used for seed treatment. *Amer. Potato J.*, **37**, 403-408.
- TIMM H., RAPPAPORT L. et collab. — 1962. Sprouting, plant growth and tuber production as affected by chemical treatment of white potato seed pieces.
IV) Responses of dormant and sprouted seed potatoes to gibb. acid. *Amer. Potato J.*, **39**, 107-115.
- TIZIO R. — 1964. Tubérisation de la pomme de terre. *Bull. Soc. Bot. Nord Fr.*, **17**, 63-68.
- TONZIG S. et BRACCI-ORSENGO L. — 1955. Sulla presenza di batteri nei vari organi delle piante superiori. *Nuovo. G. Bot. Ital.*, **62**, 1-8.
- VANCURA V. — 1961. Detection of gibberellic acid in *Azotobacter* cultures. *Nature*, G.-B., **192**, 88-89.
- VANCURA V. et MACURA J. — 1960. Indole derivatives in *Azotobacter* cultures. *Folia Microbiol.*, Tchecosl., **5**, 293-297.
- VAN HIELE F.J.H. — 1961. Unsprouted potato tubers treated with gibberellic acid. *Europ. Potato J.*, **4**, 26-39.
- VAN OVERBECK J. et DOWDING L. — 1961. Inhibition of gibberellin action by auxin. Plant growth regulation (IVth international conference). 657-663. *Ed. Iowa State University Press.* Iowa, U.S.A.
- VAN TIEGHEM P. — 1884. Développement de l'*Amylobacter* dans les plantes à l'état de vie normale. *Bull. Soc. Bot. Fr.*, **31**, 283-287.
- VARGA M.B. et FERENCZY L. — 1957. Quantitative changes in growth promoting and growth inhibiting substances in rindite treated and untreated potato tubers. *Acta Bot. Hung.*, **3**, 111-120.
- VARNER J.E. — 1964. Gibberellic acid Controlled Synthesis of α -Amylase in Barley Endosperm. *Plant Physiol.*, U.S.A., **39**, 413-415.
- VICENTE JORDANA R. — 1954. Paralización de la podredumbre del tuberculo de patata durante su periodo de germinación. *Anal. Edaf. Fisiol. veget.*, Espan., **13**, 703-724.
- VICENTE JORDANA R. — 1955. Influencia de la temperatura de germinación en la manifestación del fenómeno de bacteriostasia natural de la patata. *Anal. Edaf. Fisiol. veget.*, Espan., **14**, 519-538.
- VICENTE JORDANA R. — 1958. Cytoarjesis in potato tubers. *Microbiol.*, Espan., **11**, 1-23 ; 25-36 ; 37-58 ; 219-241.
- VICENTE JORDANA R. — 1960. The Kinetics of Cytoarjesis as determined on a macroscopic scale : Host-parasite equilibrium. *Anal. Edaf. Agrobiol.*, Espan., **19**, 69-111.
- VICENTE JORDANA R. — 1960. Cytoarjesis in potato tubers. V) Influence of germinative activity in arresting soft-rot and other infections : effects of tuber inactivation and reactivation. *Anal. Edaf. Agrobiol.*, Espan., **19**, 315-363.
- VIRTANEN A.I., HIETALA P.K. et WAHLROOS O. — 1956. An antifungal factor in maize and wheat plants. *Suomen Kemistil.*, Finland., **29**, 143-171.
- VOLCANI Z., RIKER A.J. et HILDEBRANDT A.C. — 1953. Destruction of various tissues in culture by certain bacteria. *Phytopathol.*, U.S.A., **43**, 92-94.
- VOUK V. — 1913. Die Lebensgemeinschaften der Bakterien mit einigen höheren und niederen Pflanzen. *Naturwissenschaften*, Dtsch., **1**, 81-86.

- WAKSMAN S.A. — 1948. Antagonismes microbiens et substances antibiotiques (Traduction de J. DUCHE). *Ed. SEDES*, Paris (323 p., 1.053 Réf.).
- WALLIN I.E. — 1922. On the nature of mitochondria.
I) Observations on mitochondria staining methods applied to Bacteria.
II) Reactions of Bacteria to chemical treatment.
III) The demonstration of mitochondria by bacteriological methods.
IV) Comparison study of the morphogenesis of root Bacteria and chloroplast.
Amer. J. Anal., **30**, 203-229 ; 451-471.
- WALLIN I.E. — 1922. A note on the morphology of Bacteria symbiotic in the tissues of higher organisms. *J. Bacteriol.*, U.S.A., **7**, 471-474.
- WARREN J.A. — 1910. Additional notes on the number and distribution of native legumes in Nebraska and Kansas. *U.S. Dep. Agric. Bur. Pl. Ind.*, **70**, 8 p.
- WEBER F. — 1911. Über die Abkürzung der Ruheperiode der Holzgewächse durch Verletzung der Knospen Injektion derselben mit Wasser. *Anz. K. Akad. Wiss. Wein Math-Nat.*, **1**, 182-183.
- WEBSTER G.C. — 1957. Amino-acid incorporation by intact and disrupted ribonucleoprotein particules. *J. Biol. Chem.*, U.S.A., **229**, 535-546.
- WELSCH M. — 1958. Lysis by Agents of Microbial Origin. *J. Gen. Microbiol.*, G.-B., **18**, 491-497.
- WEST C.A. et PHINNEY B.O. — 1959. Gibberellins from flowering plants. Isolation and properties of a gibberellin from *Phaseolus vulgaris*. *J. Amer. Chem. Soc.*, **81**, 2.424-2.427.
- WIGAND G. — 1884. Entstehung und Fermentwirkung der Bakterien. *Bot. Centralb.*, Dtsch., **19**, 359-361.
- WINTER A.G. et WILLECKE L. — 1952. Untersuchungen über Antibiotika aus höheren Pflanzen. *Naturwissenschaften*, Dtsch., **39**, 236-237.
- WOLLMAN E. — 1911. Sur l'élevage des mouches stériles. *Ann. Inst. Pasteur*, Paris, **25**, 79-88.
- YOMO H. et INUMA H. — 1962. The modification of the ungerminated barley endosperm with gibberellin. *Agric. Biol. Chem. Jap.*, **26**, p. 201.
- ZIMMERMANN A. — 1902. Ueber Bakterienknoten in den Blättern einiger Rubiaceen. *Jahrb. wiss. Bot.*, Dtsch., **37**, 1-11.
- ZINSSER O. — 1897. Über das Verhalten von Bakterien ins besondere von Knöllehenbakterien in lebenden pflanzlichem Geweben. *Jahrb. wiss. Bot.*, Dtsch., **30**, 423-452.
- ZIRPOLO G. — 1917. I batterie fotogeni degli organi luminosi di *Sepiola intermedia* Naef, *Bacillus pierantonii* n. sp. *Boll. Soc. Natur. Napoli.*, **30**, 206-219.
- ZIRPOLO G. — 1918. *Micrococcus pierantonii*, nuova specie die batterio fotogeno dell'organo luminoso di *Rondeletia minor* Naef. *Boll. Soc. Natur. Napoli.*, **31**, 75-87.

Table des Matières

INTRODUCTION	9
CHAPITRE I : HISTORIQUE	13
I. - Première controverse - 1884 - 1890.	14
II. - Deuxième controverse - 1910 - 1923 : « Les Sym- biotes »	18
III. - Noël BERNARD et ses travaux sur la pomme de terre.	21
IV. - SCHANDERL et la théorie de la « transmutation ».	22
V. - Observations et conceptions diverses	24
CHAPITRE II : ISOLEMENT DES BACTÉRIES - DÉTERMINATION ET RÉPARTITION	31
I. - Les conditions générales de travail	31
1. La chambre stérile	31
2. Le matériel végétal	31
3. Stérilisation de la surface des organes.	32
4. Le milieu de base	33
II. - Prélèvement et isolement des bactéries à partir des végétaux	34
1. Prélèvement dans des organes charnus.	34
2. Isolement à partir des petits organes.	34
3. Isolement des différentes espèces bacté- riennes	34
4. Nombre d'échantillons examinés	35
III. - Méthodes de détermination des bactéries	35
1. Techniques d'observations microscopiques.	36

2. Caractères macroscopiques	36
3. Caractères biochimiques	36
A) Action sur les hydrates de carbone.	37
B) Action sur les composés azotés.	37
IV. — Résultats des déterminations	40
V. — Fréquence d'isolement de chaque espèce bactérienne.	53
CHAPITRE III : OBSERVATION DES BACTÉRIES AU SEIN DES TISSUS. CYTOLOGIE ET TRAVAUX ANNEXES	55
I. — Techniques	56
II. — Étude des tubercules de pomme de terre.	58
1. Tubercules paraffinés	58
2. Tubercules en période de repos végétatif.	59
3. Structure histologique d'un tubercule de pomme de terre	60
4. La période de germination	61
5. Période de végétation	63
6. Étude de tubercules atteints de la maladie des taches rouilles	64
III. — Étude des racines tubérisées de betterave.	67
1. Étude des racines normales ou soumises à différents traitements	67
2. Modifications nucléaires sous l'influence de l'azote gazeux	71
3. Analyses chimiques après séjour en atmos- phère d'azote. Expérience avec l'azote 15.	72
VI. — Étude de la racine tubérisée de carotte.	74
V. — Études bactériologique et cytologique de jeunes pousses de maïs et de blé.	75
1. Méthode de stérilisation des caryopses.	75
2. Germination stérile des grains	76
3. Analyses bactériologiques	76
4. Observations cytologiques	78
5. Migration des bactéries au cours de la ger- mination	78
CHAPITRE IV : ÉTUDE DYNAMIQUE DE LA POPULATION BACTÉ- RIENNE DANS LE TUBERCULE DE POMME DE TERRE	79
I. — Méthodes	80
1. Méthode des explantats en milieu liquide	80
2. Méthode de numération en milieu solide	82

II. — Localisation des bactéries dans les différents tissus des tubercules	82
III. — Étude des bactéries présentes dans des tubercules d'une même variété cultivée dans des sols différents	84
IV. — Étude des bactéries présentes dans des tubercules de variétés différentes cultivées dans un même sol.	86
V. — Étude de l'évolution du nombre des bactéries dans les tubercules en cours de végétation.	87
VI. — Étude de la population bactérienne pendant la période de conservation hivernale	90
1. Conservation « naturelle » à une température proche de 15° C	90
— Expériences 62-63	90
— Expériences 63-64	91
2. Conservation « artificielle » par le froid.	94
A) Froid continu	94
— Expériences 62-63	94
— Expériences 63-64	95
B) Froid interrompu	95
— Expériences 62-63	95
— Expériences 63-64	95
3. Germination retardée par un inhibiteur chimique	97
VII. — Étude de l'évolution bactérienne en relation avec la levée de dormance	98
1. Action de diverses concentrations de rindite.	101
2. Action de diverses concentrations de thiourée	102
3. Influence de la durée et de la date du traitement par la rindite	102
4. Population bactérienne au cours de la maturation de tubercules en végétation ou pendant leur conservation au laboratoire	104
5. Influence de la date du traitement de levée de dormance	106
A) Traitement par la rindite	106
B) Traitement par la thiourée	107
VIII. — Influence de facteurs externes divers sur la population bactérienne des tubercules	107
1. Élévation de la température	108
2. Séjour sous pression réduite	108
3. Séjour dans l'oxygène	109

4. Immersion des tubercules	109
A) Dans un milieu nutritif	109
B) Dans le sublimé	110
IX. - Conclusions	111

CHAPITRE V : ÉLABORATION DE SUBSTANCES DE CROISSANCE PAR
LES BACTÉRIES HÉBERGÉES 113

I. - Étude des synthèses <i>in vitro</i>	117
1. Production d'auxine	117
A) Matériel	117
B) Recherche de l'auxine	117
a) Méthode colorimétrique	117
b) Séparation par électrophorèse	118
C) Résultats	119
2. Production de gibbérellines	120
A) Isolement	121
a) Adsorption - élution	121
b) Reprise par l'acétate d'éthyle	121
B) Séparation chromatographique	122
C) Test biologique	123
D) Résultats	126
II. - Étude des synthèses <i>in vivo</i>	128
1. Matériel végétal	128
2. Substances auxiniques	129
A) Méthodes de dosage	129
a) Extraction	129
b) Séparation	129
c) Test biologique	129
B) Résultats	130
3. Gibbérellines	130
A) Méthodes de dosage	130
B) Résultats	132
III. - Conclusions	132

CHAPITRE VI : ACTION DE DIVERSES SUBSTANCES, NOTAMMENT
D'ANTIBIOTIQUES SUR LE BOURGEONNEMENT DES
TUBERCULES DE POMME DE TERRE. 135

I. - Mode opératoire	136
II. - Action des antibiotiques	137
1. Kanamycine	137
A) Action de la kanamycine à diverses concentrations	138
B) Apport de la kanamycine dans les sept jours qui suivent la mise en expérience.	139

2. Néomycine	142
3. Spécilline	144
4. Chloramphénicol	144
5. Sulfaméthoxyypyridazine	144
III. — Action des substances de croissance.	145
1. Acide indole-acétique	145
2. Gibbérelline	145
A) Étude de l'action de l'acide gibbérellique à diverses concentrations.	146
B) Apport de l'acide gibbérellique à différents moments de l'expérience	148
3. Action combinée d'un antibiotique et de la gibbérelline	150
A) Kanamycine	151
B) Chloramphénicol	151
CHAPITRE VII : DISCUSSION	153
I. — Valeur des méthodes	153
1. Méthodes bactériologiques	153
2. Méthodes cytologiques	154
3. Méthodes de dénombrement. — Valeur statistique des résultats	155
4. Méthodes d'extraction et de dosage des substances de croissance	159
5. Étude du bourgeonnement des tubercules de pomme de terre	159
II. — Discussion des résultats	160
1. Notion de stérilité obligatoire	160
2. Interprétation pathologique	160
3. Origine des bactéries	162
4. Situation des micro-organismes au sein des organes	163
5. Les réactions de défense de la plante supérieure	163
6. Les variations du nombre de cellules hôtes.	165
7. Les variations du peuplement bactérien.	166
8. Les bactéries interviennent-elles dans le bourgeonnement des tubercules ?	167
9. Proposition d'un schéma tenant compte de nos résultats	169
10. Signification de la diminution du peuplement bactérien	175
11. Possibilité de la fixation d'azote	176

12. Nature des relations existant entre les bactéries et les plantes supérieures étudiées.	177
13. Comment intégrer nos recherches dans le contexte scientifique	179
CONCLUSIONS GÉNÉRALES	181
ANNEXES	185
1. Extrait de la préface de l'ouvrage « les Symbiotes », de PORTIER	185
2. Coloration de Gram	185
3. Coloration des spores : méthode TRUJILLO.	186
4. Mise en évidence de la capsule : Méthode de BURRI	186
5. Bouillon nutritif	187
6. Gélose nutritive	187
7. Tranches de pomme de terre	187
8. Milieu de Beerens et Guillaume pour la recherche de l'acétyl-méthyl-carbinol . .	187
9. Milieux sucrés pour l'étude des fermentations	188
A) Milieu sucré pour les Gram + sporulées (Bacillaceæ)	188
B) Milieu sucré pour les Gram — non sporulées (Pseudomonaceæ et Enterobacteriaceæ).	188
10. Milieu pour la recherche des gaz.	189
11. Gel d'amidon	189
12. Milieu de Simmons : Utilisation du citrate.	189
13. Milieu de Christensen : recherche de l'uréase.	190
14. Eau peptonée : recherche de l'indole.	190
15. Milieu pour la recherche des nitrites.	190
16. Milieu gélatiné	191
17. Milieu au lait	191
18. Milieu pour la recherche de la lécithinase.	192
19. Milieu V.L. aérobiose-anaérobiose.	192
20. Milieu pour l'étude de la mobilité.	192
21. Test du rouge de méthyle.	193
22. Recherche de l'hydrogène sulfuré	193
23. Transformation de la phényl-alanine en acide phényl-pyruvique	194
24. Test au cyanure de potassium	194
25. Décarboxylation des acides aminés.	195
26. Recherche de l'oxydase et de la cytochrome oxydase	195



27. Oxydation - Fermentation des hydrates de carbone	195
28. Pigmentation : Milieu de King	196
29. Milieu gélosé tryptosé pour numérations.	196
30. Gélose blanche	197
31. Milieu pour la recherche de l'acide indole-acétique	197

BIBLIOGRAPHIE	199
-------------------------	-----

SECONDE THÈSE

Propositions données par la Faculté

LES DIVERS ASPECTS DE LA SYMBIOSE
DANS LE RÈGNE ANIMAL

VU et APPROUVÉ

Lille, le 5 Mars 1965

*Le Doyen de la Faculté des Sciences
de Lille.*

J. TILLIEU.

Vu et permis d'imprimer,

Lille, le 15 Mars 1965

Le Recteur de l'Académie de Lille,

G. DEBEYRE

Imp. MOREL et CORDUANT
11, rue des Bouchers, - LILLE

Dépot légal n° 160

62031