

UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

THESE

présentée à

l'Université des Sciences et Techniques de Lille

pour obtenir

le grade de Docteur ès Sciences Naturelles

par

Roland BLONDEAU

CONTRIBUTION A L'ETUDE

DES INTERACTIONS PLANTES-BACTERIES

AU NIVEAU DE LA RHIZOSPHERE

Membres du Jury: MM. J. GUILLAUME, Président

L. LACOSTE }
J. POCHON } Examineurs
J.C. SENEZ }

A l'heure de remercier ceux qui m'ont aidé dans la réalisation de ce travail, ainsi que ceux qui me font le très grand honneur de bien vouloir participer à ce Jury, je suis heureux d'adresser en premier lieu mes remerciements et ma reconnaissance à Monsieur le Professeur L. LACOSTE. Il m'a toujours suivi avec une attention bienveillante et amicale, me témoignant sa confiance en me laissant une grande liberté dans la conduite de ce travail. Pendant ces quelques années que j'ai passées dans son Laboratoire de Cryptogamie, il m'a fait découvrir le sens profond de la recherche, et m'a donné les moyens de la réaliser.

Monsieur le Professeur J. GUILLAUME m'a fait profiter de sa précieuse expérience des études bactériologiques et de son enseignement moderne et critique. Ses conseils toujours judicieux dont j'ai eu constamment besoin m'ont souvent aidé. Je lui dois beaucoup et je lui suis profondément reconnaissant.

Tous mes remerciements vont aussi à Monsieur le Professeur J. POCHON, Chef du Service de Microbiologie du Sol de l'Institut Pasteur de Paris, qui a décidé de mon orientation en suggérant ce sujet de recherches. Sa bienveillance, ses précieux conseils et ses encouragements constants m'ont été très utiles.

Je tiens à exprimer toute ma gratitude à Monsieur le Professeur J.C. SENEZ, Directeur du Laboratoire de Chimie bactérienne du C.N.R.S. à Marseille qui, malgré ses nombreuses occupations, a bien voulu participer à ce Jury. Lors de mon stage de Microbiologie du Sol à l'Institut Pasteur de Paris, j'ai pu suivre son enseignement si juste et si vivant, et apprécier ses éminentes qualités pédagogiques qui m'ont efficacement servies par la suite.

Enfin, mes remerciements et ma reconnaissance vont à Monsieur le Professeur B. MONTUELLE, qui m'a donné le goût des recherches pendant les premières années que j'ai passées en Laboratoire. Après avoir préparé sous sa direction mon Diplôme d'Etudes Supérieures, il s'est toujours employé à faciliter ma tâche, et les portes de son Laboratoire m'ont toujours été très utilement ouvertes.

Bien sûr, je ne pourrai me passer de remercier mes Collègues et tout particulièrement J. DUBOIS, R. LEFEBVRE et S. RAMBOUR du Laboratoire de Physiologie végétale, R. JEAN du Laboratoire de Cytogénétique, B. DEHORTER et G. VIDAL du Laboratoire de Cryptogamie, qui m'ont très souvent et très efficacement aidés dans cette discipline nécessitant la mise en oeuvre de techniques très diverses. Leur appui moral autant que leur collaboration désintéressée m'ont souvent été très précieux. Mes remerciements vont aussi à mes camarades du Laboratoire de Chimie bactérienne de l'Institut Pasteur de Lille et du Laboratoire de Chimie biologique de l'Université des Sciences qui m'ont apporté leur aide à maintes reprises.

Enfin auprès du personnel technique et administratif du Laboratoire de Cryptogamie j'ai trouvé constamment une aide amicale et dévouée. Je leur en suis très reconnaissant, ainsi que de la sympathique atmosphère de travail et d'amitié qu'ils ont contribué à faire régner.

Depuis longtemps, de simples observations biologiques telles que l'auto-intoxication provoquée chez de nombreuses plantes par plusieurs cultures successives sur un même emplacement (DE CANDOLLE, 1832 ; MOLLIARD, 1913) l'action nocive de l'hélianthe (Helianthus scaberrimus) cultivée en couronne, qui provoque le dépérissement des plantes situées au centre de celle-ci (COPPER et STOESZ, 1931) ou encore l'effet favorable des souchets (Cyperus) pour la croissance du riz (PERALTA et DE ESTIOKO, 1923), ont permis de soupçonner la présence de substances rejetées par les racines.

Cette excrétion racinaire, phénomène longtemps controversé, a particulièrement été mise en évidence grâce à des analyses chimiques ou chromatographiques (ROVIRA, 1956) effectuées à partir du milieu de culture de plantes croissant artificiellement. Plus récemment, des techniques basées sur l'emploi de radio isotopes démontrent d'une façon encore plus évidente cette élimination (BALASUBRAMANIAN et RANGASWARI, 1968 ; Mc DOUGALL, 1968 et 1970).

Dans le sol, ces substances minérales ou organiques provoquent une stimulation souvent considérable, et une modification profonde de la flore microbienne. Des observations microscopiques (STARKEY 1938, PARKINSON et coll. 1963), des numérations sur milieux nutritifs appropriés (TAYLOR, 1951, LOCHHEAD et BURTON, 1956) ou des études manométriques (KATZ NELSON et ROUATT, 1957) prouvent cette intense activité bactérienne. La présence de ces substances crée ainsi autour du système racinaire des plantes une niche écologique particulière que l'on a appelé la Rhizosphère.

Selon RIVIERE (1959), ce fut HILTNER qui, le premier, employa ce terme en 1904 pour désigner la région du sol soumise à l'action spécifique des racines. Actuellement, on divise habituellement la rhizosphère en deux zones distinctes : la rhizosphère proche, ou rhizoplan, correspondant à la surface des racines, et la rhizosphère éloignée s'étendant suivant les plantes, à quelques millimètres ou quelques dizaines de centimètres du chevelu radicellaire.

Il nous semble superflu de refaire ici l'historique complète des recherches effectuées sur la rhizosphère. D'excellentes mises au point bibliographiques ayant été publiées (POCHON et DE BARJAC, 1958 ; BOULLARD et MOREAU, 1962 ; POCHON, 1963 ; CHALVIGNAC, 1965 ; CEZARD, 1966 ; MACURA, 1966 ; PARKINSON, 1967 ; ROVIRA, 1969 ; DOMMERGUES et MANGENO 1970).

Avant de délimiter notre travail sur l'étude des interactions plantes - bactéries au niveau de la rhizosphère, nous préciserons certains aspects de ce problème, qui sont directement liés aux recherches que nous avons poursuivies.

Tout d'abord, peut-on vraiment parler de sécrétion, d'exsudation ou d'excrétion de substances par les racines ? La sécrétion sous entend une émission active de molécules par les cellules, l'exsudation, un processus pouvant être passif, et l'excrétion un rejet de déchets hors de la cellule. Or, on a jamais pu démontrer de façon précise que les substances présentes autour du chevelu radiculaire représentaient des déchets, ni que le phénomène responsable était actif. Les termes d'excrétion et de sécrétion devraient donc être évités. Dans l'état actuel de nos connaissances sur ce problème, il nous semble que le terme le mieux adapté à ce phénomène serait celui d'"élimination". Cependant, comme la plupart des auteurs, nous emploierons indifféremment l'un ou l'autre de ces termes, sachant que nous ne leur accordons pas de sens strict.

Quels que soient les aspects de la rhizosphère que l'on étudie, il est souvent difficile de tirer une conclusion nette ou de faire un rapport concis à partir des résultats expérimentaux publiés, car la diversité des techniques culturales employées ne permet pas les synthèses. Les méthodes de culture en pleine terre ou en pots, utilisées par certains, sont peut être idéales sur le plan écologique, mais elles apportent des difficultés d'analyses parfois insurmontables, soit à cause du manque de précisions des analyses biochimiques,

soit à cause des variations souvent incontrôlables de la microflore, surtout quand les expériences ne permettent pas l'élimination de la fluctuation des conditions atmosphériques.

Inversement, les cultures de racines isolées, pratiquées en particulier par KANDLER (1951), PETRU et CHRASTIL (1955) offrent un matériel parfaitement contrôlable et une méthode d'étude très élégante, mais les résultats obtenus sont malheureusement peu significatifs car la majorité des produits diffusant à partir des racines proviennent de la partie lésée, et peut être aussi, par la suite, des processus de cicatrisation.

Par conséquent, les méthodes les plus valables sont peut être celles qui consistent à établir des rhizosphères artificielles, en cultivant les plantes sur sable, perlite, vermiculite, perles de verre, ou en milieu hydroponique. A propos de cette dernière technique, les résultats en découlant peuvent parfois être sujets à caution car les conditions sont assez éloignées de celles que l'on rencontre dans la nature, surtout quand les cultures sont effectuées, non pas sur solutions minérales, mais sur eau distillée, ce qui risque d'entraîner des phénomènes d'exosmose.

Enfin, quelques chercheurs ont utilisé des cultures sur milieux gélosés (DELEUIL, 1950 ; STOLP, 1952 ; BOWEN et ROVIRA, 1961) mais le domaine de leur utilisation est très restreint car en plus des inconvénients présentés par les cultures hydroponiques, elles sont asphyxiques.

La nature des produits d'excrétion racinaire est très variée. D'après VANCURA (1964), ils peuvent représenter jusqu'à 10 % de matière sèche de la partie aérienne des plantes. Probablement à cause de leur plus grande facilité d'identification, les substances minérales ont été reconnues les premières. HELDER (1956), CARE (1959) et RIVIERE (1959) ont particulièrement précisé la présence des ions sulfates, nitrates, chlorures et phosphates.

Parmi les substances organiques, les hydrates de carbone et les acides aminés sont le plus souvent cités, et ils ont fait l'objet de recherches plus approfondies car ils représentent des sources énergétiques et nutritionnelles pour

la microflore rhizosphérique. Nous ne mentionnerons pas ici les différents sucres et acides aminés rencontrés dans les excréments puisque nous reviendrons sur ce problème par la suite. Signalons cependant qu'en plus des sucres simples on a pu, dans certains cas, notamment par examen microscopique, révéler l'existence de matières mucilagineuses, probablement à base de substances pectiques, formant une gaine autour des racines (JENNY et GROSSENBACHER, 1964 ; DART et MERCER, 1964 ; ROVIRA, 1965).

De nombreux acides organiques ont aussi été caractérisés, et parfois en quantités relativement importantes. Ainsi, RIVIERE (1959) trouve qu'un seul plant de blé peut, jusqu'au tallage, libérer 13 mg d'acide acétique, 3,5 mg d'acide propionique, 2 mg d'acide butyrique, et 1,5 mg d'acide valérique.

Les vitamines hydrosolubles, probablement à cause de leur faible concentration et de leur difficulté de dosage ont été moins souvent recherchées. Cependant, en rassemblant les résultats acquis à partir des différentes plantes analysées, on peut dire que pratiquement toutes ces vitamines ont pu être identifiées, mais jamais à partir des sécrétions d'un seul type de plantes.

Enfin, parmi les substances moins courantes, signalons l'élimination d'enzymes telles que la phosphatase par les racines de maïs (RATNER et SAMOJLOVA, 1955), l'invertase, l'amylase et la protéase par les racines de blé (ROVIRA et Mc DOUGALL, 1967) de dérivés des acides nucléiques (LUNDEGARTH et STENLID, 1944 ; FRIES et FORSMAN, 1951 ; RIVIERE, 1959), de facteurs de croissance, qu'ils soient de type auxinique (VANCURA et HOVADIK, 1965), de type cytokinine (KENDE 1965), ou de type gibberellinique (VANCURA et HOVADIK, 1965 ; SKENE, 1965) et de coumarine ou de ses dérivés (MOTHES, 1955 ; EBERHARDT et MARTIN, 1957).

Par application foliaire de substances telles que des antibiotiques comme la streptomycine (DAVEY et PAPAWEZAS, 1961) ou le chloramphénicol (VRANY, VANCURA et MACURA, 1962), des régulateurs de croissance ou de l'urée, il est d'ailleurs possible de retrouver ces composés au niveau des racines et dans les excréments racinaires.

L'élimination de toutes ces substances organiques par le système racinaire des plantes peut varier quantitativement, et même qualitativement en fonction de nombreux facteurs, ce qui rend parfois difficile ou aléatoire la généralisation des résultats trouvés pour une plante dans des conditions déterminées. Nous n'insisterons pas sur le rôle que peut jouer le mode de culture puisque nous avons déjà évoqué ce problème. D'autres facteurs tels que la lumière, la température, les conditions ambiantes et la nutrition interviennent parfois d'une façon très spectaculaire. Par exemple, pour le blé, lorsque l'éclaircissement passe de 3.000 à 10.000 lux, il se produit une activation de l'exsudation qui modifie profondément la population bactérienne (KATZNELSON, 1960). Pour le tournesol, BELLIKOV et KIRILLOVA (1960) signalent également que l'excrétion des acides aminés est plus active le jour que la nuit. L'action de la température a été particulièrement analysée par ROVIRA (1959) qui met en évidence l'augmentation de la concentration des acides aminés, et en particulier de l'asparagine, autour des racines de tomate et de trèfle lorsque la température s'élève. Le même phénomène se produit avec des germinations de fève, de pois, et de cotonnier (SCHROTH et coll., 1966). Il n'est cependant pas général, puisque HUSAIN et Mc KEEN (1963) trouvent plus d'acides aminés dans les exsudats de fraisier cultivés à 5 - 10° qu'à 20 - 30°. Le rôle des conditions ambiantes a été étudié par KATZNELSON, ROUATT et PAYNE (1954, 1955, 1956). Ils observent une excrétion beaucoup plus abondante lorsqu'il y a alternance de périodes humides et sèches, et que la teneur en eau du sol varie. Enfin, d'après BOWEN (1969), la nutrition des plantes peut intervenir dans l'intensité de l'élimination des acides aminés. Par exemple, celle-ci peut être 2 à 3 fois plus importante quand les plantes, en l'occurrence des plantules de pin, sont déficientes en phosphate.

La plante aussi, suivant sa nature, son âge et son état, intervient dans la composition de ses sécrétions racinaires. VANCURA (1964), pour des plantes très proches telles que le blé et l'orge, signale ainsi des différences très nettes dans la composition de leurs exsudats, en ce qui concerne certains sucres

(le galactose, le glucose et le rhamnose) alors que les autres restent à des taux similaires pour les deux plantes. Récemment, on a même pu mettre en évidence une relation entre une substitution disomique de chromosomes pour un blé, et le spectre microbien de la rhizosphère (NEAL, ATKINSON et LARSON 1970). Quant à la relation existant entre l'âge de la plante et l'importance de ses sécrétions, elle a particulièrement été examinée par ROVIRA (1956), RIVIERE (1959), VANCURA et HOVADIK (1965) : Ces derniers par exemple trouvent le β - pyrazolylalanine dans l'exsudat du concombre uniquement dans les premiers stades de croissance. De même avec la tomate et le poivrier, ils caractérisent la tyrosine seulement lors de la formation des fruits, et pas aux autres stades du développement. Enfin, l'état de la plante intervient : KATZ-NELSON et coll. (1954 - 1955) ainsi que MARTIN (1957) trouvent que l'émission des substances est plus importante quand il y a flétrissement des plantes.

Enfin, il est peut être encore utile de préciser la signification du terme spermosphère, et d'en déterminer ses relations avec la rhizosphère. Si nous prenons comme définition de la rhizosphère, la zone du sol dans laquelle la microflore tellurique subit l'influence des racines, nous pouvons définir la spermosphère, comme la zone du sol dans laquelle la microflore épiphytique de la graine et la microflore tellurique subissent l'effet de la germination.

Deux paramètres d'ordre microbiologique interviennent donc ici : le premier étant représenté par la microflore épiphytique qui est toujours présente sur les téguments, et dont la nature a déjà fait l'objet d'une synthèse bibliographique importante (VERONA, 1963), le second étant l'état microbiologique du sol. Ce sera donc l'ensemble microbien apporté par la graine, ou plus généralement par la semence, qui va surtout différencier la spermosphère de la rhizosphère. D'après VAGNEROVA cependant (1963) les bactéries de la graine ne sont capables de coloniser et de proliférer sur les racines qu'en absence de la flore tellurique. En sa présence, seuls les germes chromogènes et les Pseudomonas pigmentés, considérés comme épiphytiques, persistent sur les racines.

Enfin, ces germes présents sur les graines, ainsi que les substances secrétées pendant la germination, comme nous l'avons constaté pour le système racinaire, présentent aussi des fluctuations en fonction de la variation des conditions externes (HAYMAN, 1969 ; LEELAVATHY, 1970).

Le but de notre travail était d'analyser quelques problèmes particuliers de la rhizosphère : d'abord, les caractéristiques microbiologiques précises de la microflore rhizosphérique, rarement étudiées, dont les données actuelles sont souvent vagues ou contradictoires ; puis, et surtout, les produits de synthèse bactérienne pouvant intervenir soit dans la croissance de la plante, soit dans l'équilibre ou le cycle biologique de la microflore tellurique dans son ensemble.

Pour mener à bien ces recherches, nous avons choisi un matériel végétal convenant le mieux possible aux exigences expérimentales et aux données du problème : le Colza ; et nous nous sommes consacrés uniquement à l'étude de la "jeune" rhizosphère, induite par la croissance des plantules pendant les premières semaines de culture.

Après un rapide exposé de deux techniques qui sont à la base de presque toutes nos expériences : la culture des graines et les dosages microbiologiques des vitamines, nous étudierons successivement :

1 - les substances organiques éliminées par les plantules, et leur utilisation par la microflore. En raison de leur aspect nutritionnel, notre attention s'est surtout portée sur l'évolution des acides aminés et des vitamines hydrosolubles.

2 - les caractéristiques de la microflore rhizosphérique, tant sur le plan physiologique et nutritionnel que sur le plan écologique. Nous insisterons dans ce chapitre sur l'importance du spectre microbien de la microflore tellurique de départ, inévitablement significative.

3 - quelques aspects particuliers que nous avons pu mettre en évidence à partir de ces premiers résultats :

- la synthèse de vitamine B₁₂ et son importance dans la rhizosphère
- la nature et l'évolution des composés foliques
- enfin la production d'une substance de type cytokinine par des Arthro-bacter rhizosphériques.

Dans ce mémoire, nous avons ainsi scindé le compte rendu de nos expériences en cinq parties, correspondant aux différents points étudiés.

Dans la mesure du possible, nous avons incorporé dans le texte les notes imprimées qui ont été publiées. Cependant, par souci d'homogénéité et pour permettre une lecture plus facile, toutes les références bibliographiques sont rassemblées et classées à la fin du mémoire.

MATERIEL ET TECHNIQUES

Les techniques utilisées sont très variées, car pour l'étude de la rhizosphère, le double aspect végétal et microbien du problème implique tour à tour des analyses biologiques, biochimiques et bactériologiques. Cependant, deux techniques particulières seront presque constamment employées : la culture des graines pour l'obtention des excretions racinaires et les dosages vitaminiques. Dans ce premier chapitre, nous analyserons ainsi en détail ces techniques fondamentales tandis que les autres seront mentionnées dans les modalités opératoires des chapitres suivants.

A - LE CHOIX DE LA GRAINE.

Pour une étude se limitant aux premiers stades du développement d'une plante, le choix de la graine présente une très grande importance. En effet, si nous voulons limiter au minimum l'établissement d'une spermosphère, il nous fallait une graine, d'une part facilement stérilisable afin d'éliminer tout apport de germes épiphytiques, et d'autre part contenant peu de substances de réserves, afin que l'exsudation possible de ces substances au moment de la germination n'affecte pas la composition chimique des exsudats proprement racinaires. Après plusieurs essais avec différents types de semences, nous avons finalement conservé la graine de Colza (Brassica napus oleifera) qui présente en plus l'avantage de germer rapidement dans nos conditions expérimentales. Cette graine, entourée d'un fin tégument, est constituée par deux cotylédons peu volumineux recouvrant l'embryon. Nous avons successivement utilisé plusieurs variétés : Valois, Crésus et Régina.

Pour la stérilisation, des expériences précédemment effectuées avec des akènes d'endive (Cichorium intybus) nous ayant montré la diminution du pouvoir germinatif des graines lorsque le chlorure mercurique est employé (BLONDEAU, 1965), nous avons éliminé cet antiseptique et préféré l'hypochlorite de calcium (il est utilisé en solution à raison de 35g. par litre).

B - LES TECHNIQUES DE CULTURE.

Suivant le but désiré : la récupération des excréments, la récupération des plantules, ou la recherche d'une action microbienne au niveau du système racinaire, nous avons utilisé diverses méthodes : la culture en tubes spéciaux, en tubes simples, ou en milieu hydroponique.

1 - Cultures en tubes spéciaux :

L'exposé de cette technique a été publié (Bull. Soc. Bot. Nord Fr., 1968, 21).

BULLETIN
DE LA SOCIÉTÉ DE BOTANIQUE
DU NORD DE LA FRANCE

Tome XXI, (1968) n° 3

EXTRAIT

TECHNIQUE DE CULTURE POUR L'ÉTUDE
DES INTERACTIONS MICROBIENNES AU NIVEAU
DU SYSTÈME RADICULAIRE DES PLANTULES

par R. BLONDEAU (*)

Les techniques le plus souvent employées pour l'étude de la rhizosphère des jeunes plantes sont basées sur l'utilisation de cultures en terre (SZEMBER 1959, MILLER et SCHMIDT 1965) ou de cultures hydroponiques.

Si les premières respectent les conditions écologiques de germination, elles sont cependant peu courantes car le substrat de germination est très variable et chimiquement trop complexe.

Les cultures hydroponiques, au contraire, permettent l'emploi de milieux de culture synthétiques qui offrent, de plus, l'intérêt d'être directement utilisables, sans élution préalable, pour les analyses biochimiques. Écologiquement, ces cultures sont pourtant très critiquables, aussi bien pour l'étude des phénomènes physiologiques intervenant au niveau du système racinaire des plantules, que pour l'étude des interactions microbiennes.

Les conditions expérimentales que l'on doit faire intervenir pour ce genre de travail consistent donc, d'une part, à utiliser un substrat de germination convenable et, d'autre part, à prévoir la possibilité d'une élution « in situ » des substances éliminées par les racines.

Ainsi KHAN (1948) utilise par exemple le sable comme substrat. Grâce à une technique très simple ce sable est constamment imbibé par la solution nutritive, disposée à l'extérieur du tube de germination. Le problème de l'élution n'est cependant pas résolu.

STOTSKY, CULBRETH et MISH (1962) après de nombreux essais, trouvent aussi que le sable constitue le meilleur substrat utilisable. La technique de culture qu'ils ont mis longuement au point apparaît très intéressante, mais elle est beaucoup trop complexe pour effectuer des analyses en séries, ou pour étudier les phénomènes se limitant seulement aux premiers stades de développement des plantules.

(*) Séance du 15 mai 1968.

Dans le cadre de l'étude des interactions nutritionnelles entre les plantules de colza et diverses microflore telluriques, nous préférons utiliser des tubes de culture contenant de la laine de verre, supportant comme substrat de germination du sable de Fontainebleau lavé aux acides. Les conditions écologiques semblaient ainsi respectées, mais le problème de l'éluion restait toutefois posé.

Dans cette note, nous exposons une nouvelle technique de culture très simple permettant, in situ, une éluion en série des substrats de germination. Nous précisons aussi les conditions que nous respectons pour le choix, la préparation et l'utilisation de la « microflore de référence » ensemencée dans les tubes.

TECHNIQUE DE CULTURE

Tubes de culture :

Les tubes de culture employés (240 × 40) comportent deux parties : une pièce supérieure, au fond de laquelle est soudé un disque de verre fritté (porosité 1), et une pièce inférieure, en forme de coupelle, surmontée par un rodage femelle s'adaptant exactement à la base de la pièce supérieure. Chacune de ces pièces est en plus garnie de deux ergots permettant de les maintenir solidaires.

Sur le disque de verre fritté est placée de la laine de verre, supportant le substrat de germination : 20 g de sable de Fontainebleau lavé aux acides.

Pour la germination du colza, la solution de KNOP diluée de moitié sert de milieu nutritif. Une microflore de référence diluée au 1/1.000 est ajoutée à raison de 1 ml pour 9 ml de KNOP. Le tout est réparti à raison de 10 ml par tube.

Pour les cultures témoins, cette microflore diluée au 1/1.000 a été stérilisée à l'autoclave avant son addition au milieu de KNOP.

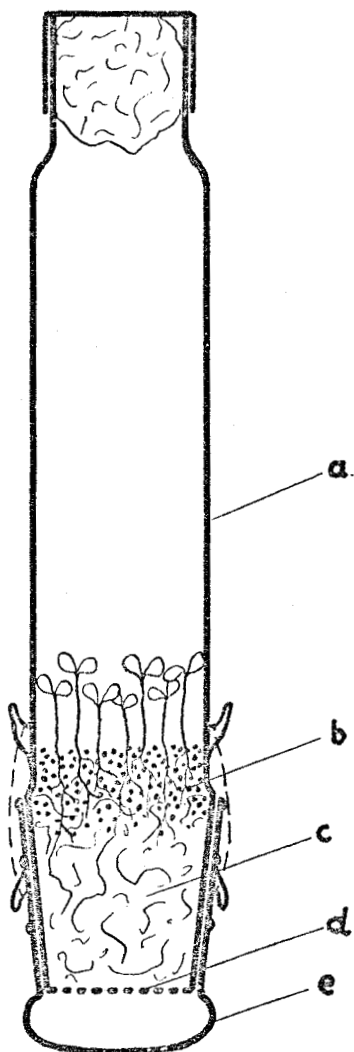
Après ensemencement des graines, préalablement stérilisées à l'hypochlorite de calcium, les tubes de culture sont recouverts d'un papier d'étain et placés dans une pièce régulée à 20° C. Ils sont soumis à un éclairage de 3.000 lux, 12 heures par jour.

Eluion des substances présentes dans le substrat de germination :

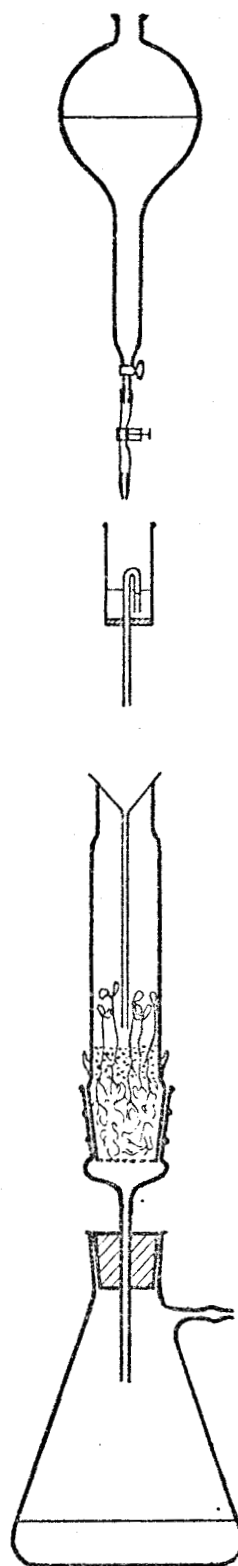
Après un temps déterminé de germination, les tubes de culture sont élués de la façon suivante :

— On enlève la pièce inférieure du tube, et on adapte la pièce supérieure contenant le semis dans un entonnoir possédant un rodage de même diamètre, et branché sur une fiole reliée à une rampe à vide.

— Au-dessus de chacun de ces tubes, et dans le même axe, sont disposés successivement un siphon calibré à 15 ml et une ampoule à décanter contenant de l'eau bidistillée. Le débit d'écoulement de cette eau est réglé à 1,5 ml par minute par l'intermédiaire d'une pince de morh disposée sous le robinet de l'ampoule.



- a : pièce supérieure
b : sable
c : laine de verre
d : verre fritté
e : pièce inférieure



TUBE DE CULTURE ET DISPOSITIF D'ELUTION

— Lorsque tous les tubes (5 ou 10) sont adaptés à cette rampe d'élu-tion on actionne la pompe à vide et on ouvre tous les robinets des ampou-les. Par fractions de 10 mn, 15 ml d'eau bidistillée va ainsi successive-ment éluer le substrat de germination des tubes.

Des essais préalables effectués sur la récupération des acides aminés présents dans le substrat de germination, ont montré que trois élu-tions successives de 15 ml sont suffisantes pour tout éluer.

Le tableau suivant donne, à titre d'exemple, les résultats obtenus à partir d'une culture de colza après sept jours de germination. Après chaque élution, les acides aminés totaux retenus sur résine Dowex 50 sont dosés suivant la méthode de TROLL et CANNAN. Ces résultats sont rapportés à un tube de culture (25 plantules).

	1 ^{re} élution	2 ^e élution	3 ^e élution	4 ^e élution
Acides aminés en μM	0,136	0,038	0,008	—

Enfin, après élution de tous les tubes correspondant à une même expé-rience, les éluats sont rassemblés et filtrés, d'abord sur préfiltres, puis sur membranes « Millipore » de 0,45 μ .

MICROFLORE TELLURIQUE DE REFERENCE

Terre utilisée :

L'origine de la microflore employée dans toutes les expériences pro-vient d'une terre qui correspond aux exigences que nous nous sommes imposées, c'est-à-dire :

- elle ne doit pas être cultivée ;
- elle ne doit pas avoir reçue d'amendements aussi bien organiques que minéraux depuis plusieurs années ;
- elle ne doit pas avoir été traitée par des herbicides ou autres pro-duits chimiques.

Selon nous, la microflore contenue dans une telle terre répond assez bien aux nécessités des expériences, c'est-à-dire à l'utilisation d'une micro-flore tellurique naturelle d'une part, et stable dans le temps d'autre part, d'où le terme de « microflore de référence » que nous lui avons prêté.

Préparation de la terre :

Elle est tout d'abord séchée à température ambiante en lits peu épais dans une éluve à ventilation, pendant un à deux jours suivant son taux d'humidité.

Elle est ensuite passée sur un tamis à mailles très serrées de façon à ne retenir que les fines particules donnant une masse homogène.

Pour la conserver ensuite en modifiant le moins possible le nombre de bactéries présentes, ainsi que l'équilibre biologique des différents micro-organismes, nous la plaçons dans un dessiccateur à vide entreposé dans une chambre froide. Le fond de celui-ci est en plus garni de chlorure de calcium. Après chaque prélèvement, nous faisons systématiquement le vide, et nous rétablissons la pression à l'intérieur du récipient en ne faisant pénétrer que de l'air desséché.

Caractéristiques de la microflore :

Lorsqu'une terre a été conservée de cette façon, nous considérons qu'elle peut être utilisée pendant au moins huit mois.

En effet, les nombreuses numérations bactériennes que nous avons effectuées à partir de la terre précédemment définie nous ont donné des résultats stables pendant cette période, et compris entre 25 et 30 millions de germes par gramme de terre.

Au point de vue du pouvoir de synthèse de ces bactéries, étudié suivant la technique de LOCHHEAD et CHASE :

- 34 % étaient capables de proliférer sur un milieu contenant simplement des sels minéraux et du glucose ;
- 20 % exigeaient la présence d'acides aminés ;
- 16 % exigeaient la présence de vitamines ;
- 30 % exigeaient la présence d'autres facteurs de croissance présents dans l'extrait de levure et l'extrait de terre.

Utilisation de cette microflore pour l'étude de la rhizosphère :

Aussi bien pour la numération de la flore totale que pour la préparation d'un « inoculum », nous préparons d'abord la suspension dilution au 1/10 en versant 10 g de terre dans un erlen contenant 90 ml d'eau physiologique stérile, et nous plaçons à l'agitation magnétique pendant une demie heure.

Ensuite, nous préparons les autres dilutions en utilisant des erlens contenant 90 ml d'eau physiologique stérile.

Pour l'ensemencement des tubes de culture, nous procédons de la façon suivante : nous effectuons la dilution au 1/10.000 en utilisant des erlens contenant 90 ml de milieu de KNOP stérile, et nous répartissons celui-ci à raison de 10 ml par tube de culture. En utilisant la terre précédemment décrite, chaque tube reçoit ainsi 25.000 à 30.000 bactéries.

Pour les numérations de microflore enfin, nous utilisons le milieu gélosé défini par BUNT et ROVIRA.

CONCLUSION

Cette technique de culture présente surtout comme intérêt l'utilisation d'un matériel simple et d'un substrat de germination bien aéré, permettant un développement normal du système racinaire des plantules.

Cependant, ainsi définie, cette technique n'est utilisable que pour l'étude des premiers stades de la croissance des plantules, c'est-à-dire pendant 20 à 25 jours de culture. Ensuite, le milieu de culture devenant déficient, de nouveaux phénomènes physiologiques risquent de perturber celui qui est analysé.

Notons cependant qu'il est possible de prévoir un système d'alimentation continu en liquide nutritif, mais chaque tube perd alors son autonomie, et la méthode ne répond plus aux besoins demandés.

BIBLIOGRAPHIE

- BUNT J.S. et ROVIRA A.D. (1955). — Microbiological studies of some subantarctic soils.
J. Soil Sci., 6, 119-128.
- KHAN I.U. (1948). — A technique for growing citrus seedlings under aseptic conditions of culture.
Phytopathology, 38, 756-757.
- LOCHHEAD A.G. et CHASE F.E. (1943). — Qualitative studies of soil microorganisms. V. Nutritional requirements of the predominant bacterial flore.
Soil Sci., 55, 185-195.
- MILLER R.H. et SCHMIDT E.L. (1965). — A technique for maintaining a sterile soil. Plant root environment, and its application to the study of amino acids in the rhizosphere.
Soil Sci., 100, 267-273.
- STOTSKY G., CULBRETH W. et MISH C.B. (1962). — Apparatus for growing plants with aseptic root for collection of root exudates and CO₂.
Plant Physiol., 37, 332-341.
- SZEMBER A. (1959). — Providing aseptically cultivated plants with water through bacteria tight glass-filters.
Plant and Soil, 11, 392-394.
- TROLL W. et CANNAN R.K. (1953). — A modified photometric ninhydrin method for the analysis of amino and imino acids.
J. Biol. Chem., 200, 803-811.

2) Cultures en tubes simples :

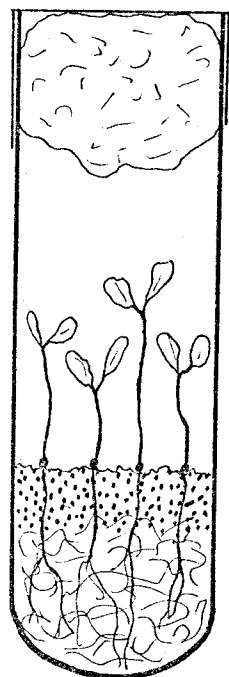
Ce sont des tubes en pyrex de 4 x 15 cm, ou de 4 x 20 cm, dont le fond est garni de laine de verre non tassée surmontée de 15 ou 20 g. de sable de Fontainebleau lavé aux acides (Prolabo) ou de sable de mer purifié (Merck). Après stérilisation par autoclavage, chacun des tubes reçoit généralement 10 millilitres de la solution nutritive de Knop diluée au demi ; et après un léger "labourage" de la surface à l'aide du fil d'un manche Pasteur, qui favorisera la germination, les tubes peuvent recevoir 15 à 25 graines de Colza. Précisons toutefois que les tubes et le milieu nutritif doivent être obligatoirement stérilisés séparément, sinon, la laine de verre, d'une part ne jouera plus son rôle d'aération du substrat de germination, d'autre part risque d'émettre une quantité appréciable d'ions dans le milieu, pouvant inhiber la germination des graines. Après ensemencement, le bouchon en coton cardé des tubes est flambé, et l'extrémité supérieure de ces tubes est recouverte par du papier d'étain stérilisé.

3) Cultures hydroponiques :

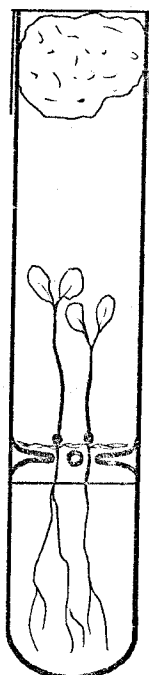
Elles ont été effectuées soit en tubes à ergots, soit en flacons spéciaux. Ces tubes (2,5 x 20 cm) présentent au quart de leur hauteur 4 ergots internes, disposés en croix, permettant de supporter un disque de coton hydrophile ou de coton cardé sur lequel sont déposées les graines. Le milieu nutritif est toujours la solution de Knop (20 ml/tube).

Les flacons spéciaux sont constitués par des erlens de 1 litre modifiés par soudure, au tiers de leur hauteur, d'une tubulure latérale en forme de croix de 2 cm de diamètre, destinée à recevoir une graine, pouvant germer sur un disque en coton hydrophile maintenu sur 4 ergots internes comme précédemment. A l'aide de bouchons en coton cardé, disposés dans les branches de la tubulure, il est possible de maintenir la stérilité du milieu de culture au moment où la partie foliaire de la plantule croît en dehors du flacon.

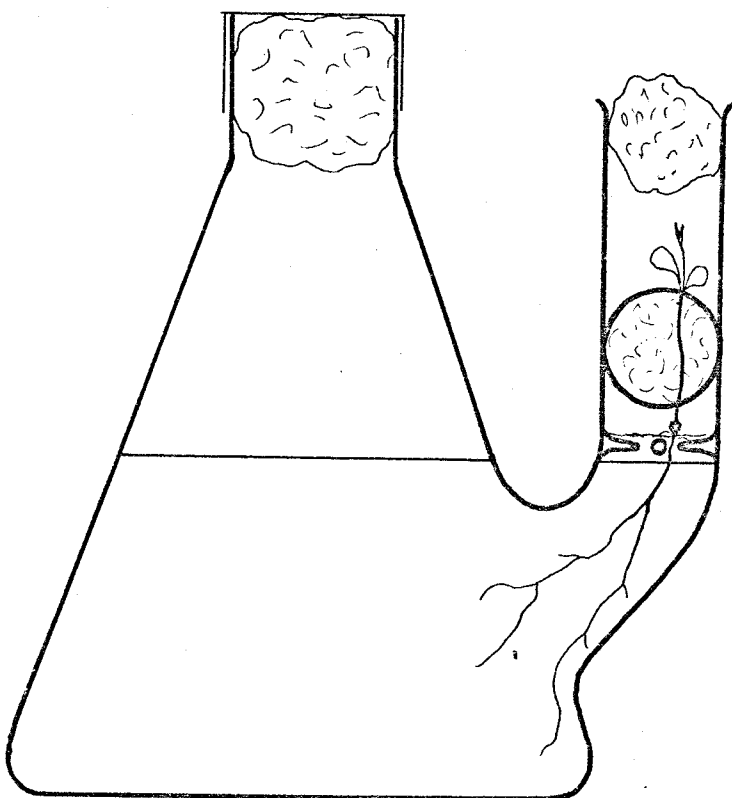
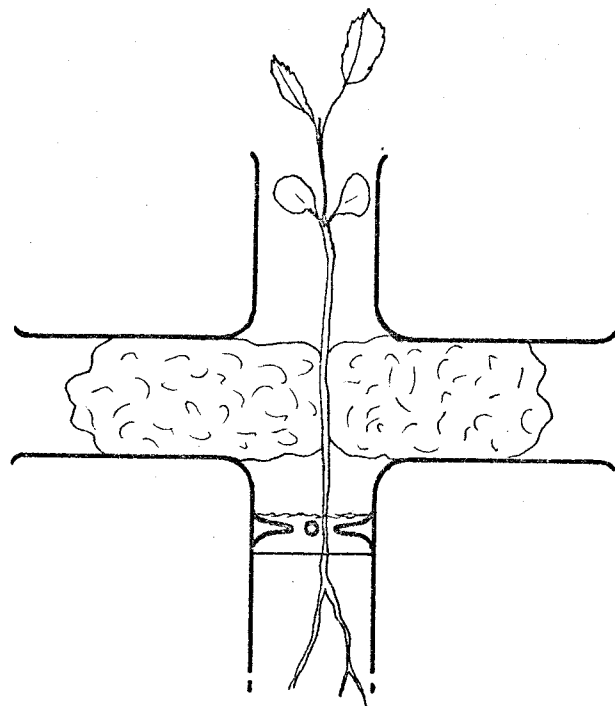
Ces différents dispositifs de germination sont représentés sur la planche qui suit.



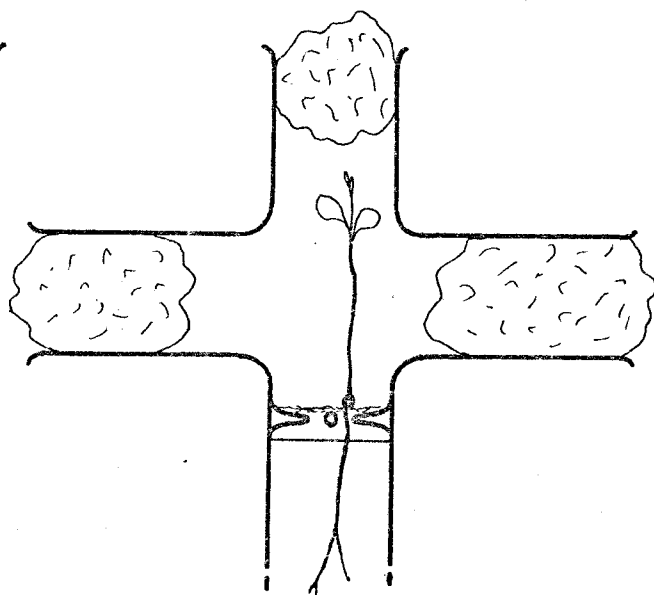
A



B



C



C'

A : Culture en tubes sur sable

B : Culture hydroponique en tubes

C : Culture hydroponique en erlens (vue de profil)

C' : Culture hydroponique en erlens (vue de face de la tubulure)

en bas : plantule jeune

en haut : plantule plus âgée.

C - TECHNIQUES DES DOSAGES VITAMINIQUES.

Nous n'exposerons dans ce chapitre que les techniques microbiologiques de dosages vitaminiques basées sur l'utilisation des souches provenant de l'American Type Culture Collection (ATCC). Mais avant d'employer ces souches, nécessitant l'utilisation de milieux de culture très divers et très complexes, rendant les dosages assez onéreux, nous avons effectué nos premiers essais à l'aide d'une collection de souches sélectionnées par LOCHHEAD (COOK et LOCHHEAD, 1959)(*). La technique employée pour ces souches est détaillée dans la première partie de ce travail.

1 - Principe et modalités expérimentales des dosages :

La méthode est basée sur l'utilisation de microorganismes ne pouvant, naturellement ou par mutation, synthétiser un facteur de croissance, et présentant alors pour celui-ci un besoin absolu. La croissance de ces microorganismes sera donc, dans certaines limites, proportionnelle à la quantité du facteur de croissance, présent dans un milieu de culture, complet par ailleurs.

Le dosage repose ainsi sur l'établissement d'une gamme étalon et d'une gamme expérimentale de tubes contenant généralement 5 ml du milieu de culture uniquement déficient en la vitamine à doser, et préparé à une concentration double de la concentration finale correspondant à l'optimum de croissance pour la souche test utilisée. Tous les milieux proviennent de la firme "Difco-laboratories", et ont été préparés suivant leurs indications (dans les cas contraires, les modifications seront signalées le cas échéant).

Après stérilisation des tubes par autoclavage, ceux de la gamme étalon reçoivent des quantités croissantes d'une solution étalon de la vitamine à doser sauf le premier, considéré comme le témoin de stérilisation, et le second, comme témoin de pureté du milieu. Les solutions étalon sont stérilisées par autoclavage pour les vitamines thermorésistantes, et par filtration (Millipore 0,45 μ) pour celles qui sont thermolabiles. Elles sont conservées

(*) ces souches nous ont été transmises par Monsieur POCHON (Institut Pasteur de Paris - Service de Microbiologie du Sol).

à 4°C dans un récipient opaque pour les vitamines photolabiles, et sont renouvelées, pour la plupart, tous les 2 mois.

Les tubes de la gamme expérimentale du dosage reçoivent des doses croissantes de la solution dont on veut connaître la teneur en vitamine (généralement de 0,1 à 5 ml).

Finalement, tous les tubes sont complétés à 10 ml avec de l'eau bi-distillée stérile et, à part le premier, sont inoculés par la souche test choisie.

2 - Souches test employées :

Ce sont des bactéries, des levures ou des algues :

bactéries	:	<u>Lactobacillus casei</u> ATCC 7469
		<u>Lactobacillus plantarum</u> ATCC 8014
		<u>Lactobacillus leichmannii</u> ATCC 4737
		<u>Lactobacillus leichmannii</u> ATCC 7830
		<u>Lactobacillus viridescens</u> ATCC 12706
		<u>Streptococcus faecalis</u> ATCC 8043
		<u>Pediococcus cerevisiae</u> ATCC 8081
levure	:	<u>Saccharomyces carlsbergensis</u> ATCC 9080
algue	:	<u>Ochromonas malhamensis</u> ATCC 11532.

A part O. malhamensis, toutes les autres souches sont conservées en collection par repiquage mensuel sur les milieux gélés conseillés par "Difco". L'ensemencement se fait par piqure, et après incubation, la collection est maintenue à 4°C.

Pendant la période de dosage, les souches utilisées sont repiquées chaque jour de façon à obtenir des réponses plus actives. Elles sont incubées à 28 ou 37°C suivant les germes, et la veille de chaque dosage, elles sont ensemencées dans un milieu liquide qui a la composition du milieu de base correspondant à la souche, enrichi de la quantité de vitamine égale à la dose la plus forte de la gamme d'étalonnage de sorte qu'après incubation à la température optimum, le milieu en soit totalement dépourvu. Cette culture sert à la préparation de l'inoculum destiné aux tubes de la gamme étalon et de la gamme expérimentale. Après centrifugation, le culot de sédimentation obtenu est lavé, et les cellules sont émulsionnées dans un tampon physiologique. A partir de cet inoculum, chaque tube des gammes de dosage (sauf le 1er tube de la gamme étalon)

estensemencé à raison d'une goutte par tube. Cependant, pour tous les dosages n'exigeant pas l'obtention d'un "blanc" (2ème tube de la gamme étalon) très faible, nous ne procédons pas à ce lavage qui provoque parfois une diminution de la sensibilité du test. L'inoculum est alors préparé simplement en effectuant une dilution de la culture initiale au 1/200 dans un tampon physiologique.

Pour O. malhamensis, la conservation de la souche s'effectue par repiquage, tous les 5 jours, dans un milieu liquide (Bacto-B₁₂ Ochromonas Medium-Difco) complétement en vitamine B₁₂, et incubé à 28°C en présence de lumière. Ce même milieuensemencé, après 5 jours d'incubation, sert directement d'inoculum et peut être réparti dans les tubes à raison de 1 goutte par tube.

3 - Lecture des résultats et calcul :

Après incubation à 28° ou 37°C à l'obscurité, et généralement pendant 20 à 30 heures (sauf pour O. malhamensis qui est incubé en agitation continue pendant 4 jours), la lecture des résultats s'effectue par néphélométrie. Cette méthode permet une augmentation de la sensibilité du dosage par rapport aux lectures effectuées en turbidimétrie, et une plus grande rapidité par rapport aux lectures acidimétriques. L'appareil utilisé est le "Lumetron 402 E" (Photovolt) équipé d'un galvanomètre à réflexion multiple et du filtre 515 mμ. Pour les lectures, nous diluons souvent le contenu des tubes au demi avec de l'eau distillée, permettant l'utilisation d'une cuve de 20 ml.

La lecture néphélométrique de chacun des tubes de la gamme d'étalonnage, exprimée en % de lumière dispersée, est alors représentée graphiquement en fonction des concentrations vitaminiques. On obtient la courbe étalon du dosage, présentant souvent, pour les faibles concentrations, une partie rectiligne, suivie d'une courbure.

Pour le calcul de la concentration en vitamine des tubes de la gamme expérimentale, seuls sont retenus les résultats néphélométriques rapportables ; à partir de l'axe des ordonnées, sur la partie rectiligne de la courbe étalon. Par extrapolation en fonction du volume de solution étudiée incorporée dans ces tubes, on en déduit la concentration vitaminique par ml de la so-

lution initiale. La représentation graphique des résultats obtenus à partir de la gamme expérimentale du dosage permet aussi de contrôler l'absence de substances stimulatrices pouvant fausser l'exactitude du dosage.

Les planches qui suivent ce chapitre présentent les courbes d'étalonnage obtenues avec la plupart des souches test employées. Par la même occasion, elles indiquent les références des milieux et des vitamines utilisées, ainsi que la limite de sensibilité du dosage.

4 - Dosages vitaminiques effectués après fractionnement chromatographique :

Dans la plupart des cas, surtout lorsque toutes les vitamines hydrosolubles sont à doser dans une solution ou dans un extrait végétal, aucun fractionnement n'est nécessaire. Cependant, l'utilisation de certaines souches test, très spécifiques, telles que O. malhamensis, n'est possible qu'après une purification des extraits, qui sont passés sur résines Dowex ou Amberlite. Lorsqu'un facteur de croissance est étudié en détail, le fractionnement devient aussi nécessaire car il va permettre soit une confirmation biochimique de l'étude microbiologique, soit une caractérisation de sa forme moléculaire.

Ainsi, pour l'étude particulière de la vitamine B₁₂ et des composés foliques, nous avons souvent, avant le dosage microbiologique, chromatographié les solutions étudiées, sur colonnes de Sephadex de différents types ou de cellulose, ou sur papier en élution ascendante ou descendante. Le détail des techniques employées est donné dans la 3e et 4e partie de ce mémoire. Après chromatographie sur colonne, les fractions sont recueillies dans des tubes, généralement à raison de 5 ml par fraction, à l'aide d'un collecteur du type "Ultrø Rac LKB 7000" muni d'une pompe péristaltique "Perpex". Le dosage vitaminique est alors effectué en prélevant une partie aliquote de chaque fraction et en l'incorporant dans 5 ml du milieu de base convenant à la souche test employée. Les tubes sont ensuite complétés à 10 ml avec de l'eau bidistillée et après autoclavage, l'inoculation s'effectue comme précédemment. Une gamme étalon de dosage est préparée parallèlement chaque fois qu'une donnée quantitative est nécessaire. Soulignons pourtant que cette méthode n'est valable que pour les vitamines thermorésistantes.

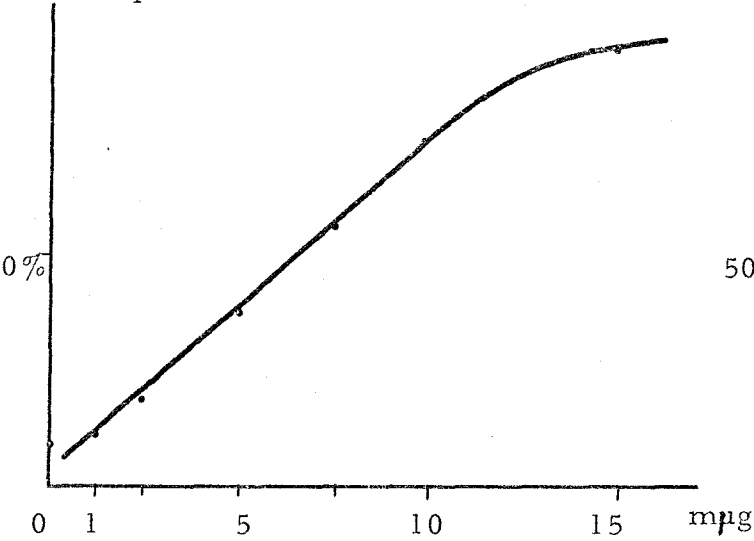
Pour la révélation des chromatogrammes, nous avons très rarement employé la technique bioautographique, qui consiste à déposer le papier, après séchage et stérilisation, sur une plaque contenant le milieu de base gélifié avec son inoculum, et à incuber la plaque après diffusion des substances chromatographiées. Cette technique, classique et rapide, s'est souvent avérée trop peu sensible pour nos tests. De plus, si elle reste la seule technique pratique valable pour caractériser la migration des facteurs thermolabiles, elle n'est cependant pas utilisable lorsque la souche test est une algue.

Nous lui avons ainsi préféré la technique qui consiste, après séchage, à découper le papier correspondant à la migration de chaque tache chromatographiée en bandes transversales de 1 cm, à éluer chacune d'elles dans des tubes numérotés pourvus de 5 ml d'eau bidistillée contenant éventuellement une substance protectrice de la vitamine, et à compléter enfin les tubes avec le milieu de base convenant à la souche test choisie. Après autoclavage, inoculation, incubation et lecture néphélométrique des tubes, cette technique permet en plus l'obtention de données quantitatives quand une gamme d'étalonnage est préparée parallèlement. Nous avons d'ailleurs employé ces mêmes modalités techniques pour la révélation des électrophorégrammes.

THIAMINE

S: *L. viridescens* ATCC 12706
 M: Bacto-Thiamine Assay Medium LV
 V: Thiamine hydrochloride NBC
 I: Bacto-APT Broth

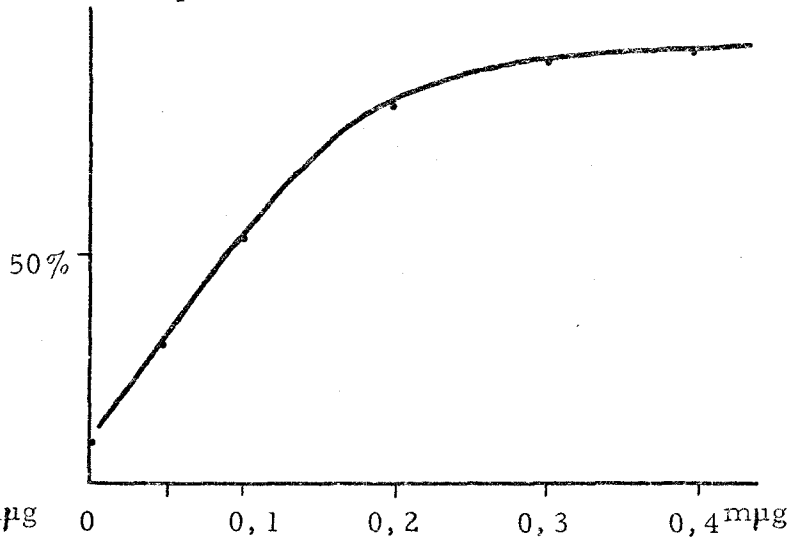
lect. néph.



ACIDE NICOTINIQUE

S: *L. plantarum* ATCC 8014
 M: Bacto-Niacin Assay Medium
 V: Ac. Nicotinique NBC
 I: Bacto-Micro Inoculum Broth

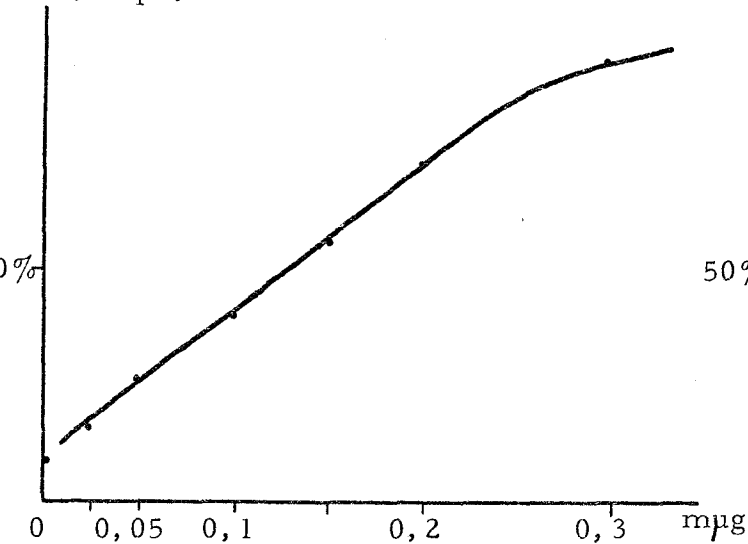
lect. néph.



BIOTINE

S: *L. plantarum* ATCC 8014
 M: Bacto-Biotin Assay Medium
 V: Biotine NBC
 I: Bacto-Micro Inoculum Broth

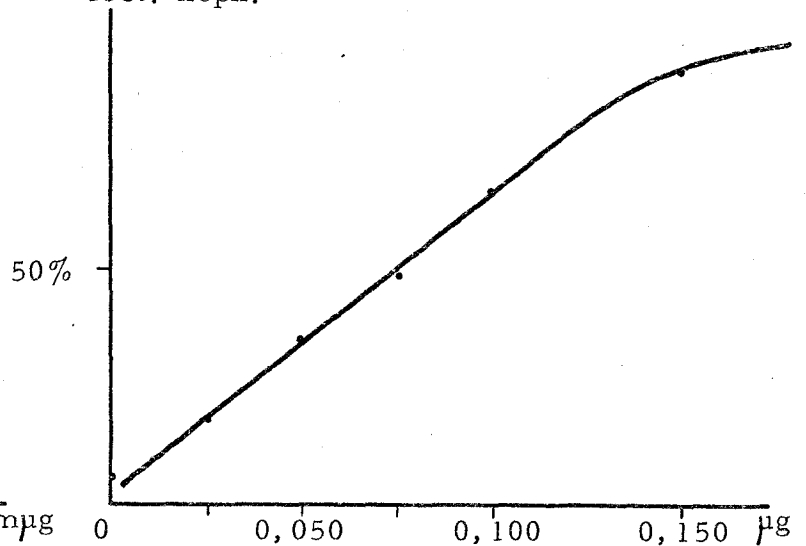
lect. néph.



RIBOFLAVINE

S: *L. casei* ATCC 7469
 M: Bacto-Riboflavine Assay Medium
 V: Riboflavine NBC
 I: Bacto-Micro Inoculum Broth

lect. néph.



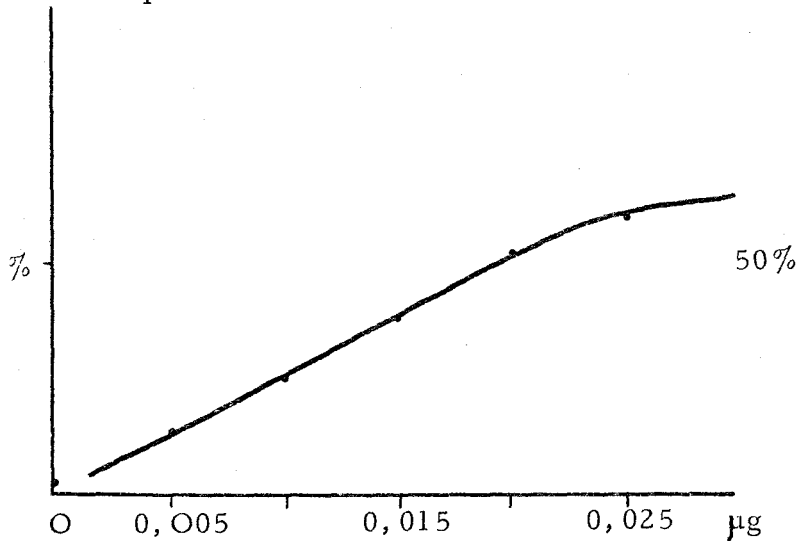
COURBES d'ETALONNAGE POUR QUELQUES VITAMINES

S=souche M=milieu de base V=origine de la vitamine I=inoculum

ACIDE PANTOTHENIQUE

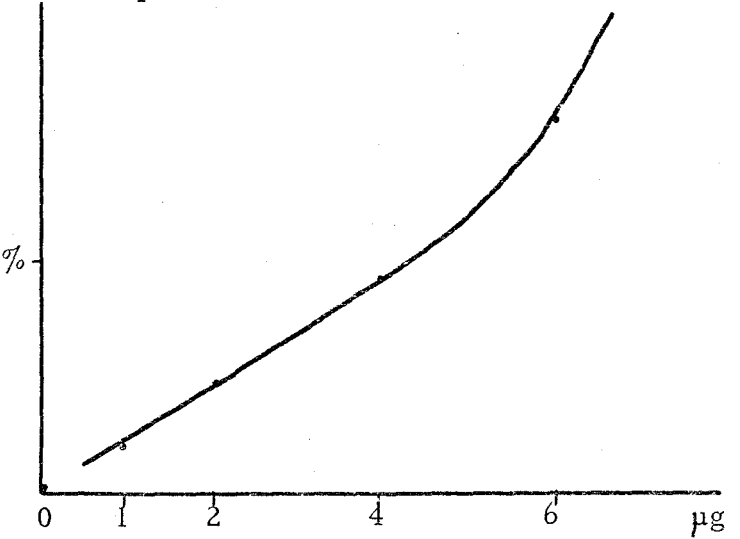
S: *L. plantarum* ATCC 8014
 M: Bacto-Pantothenate AOAC Medium
 V: Pantothenate de Ca Merck
 I: Bacto-Lactobacilli Broth AOAC

lect. néph.

PYRIDOXINE

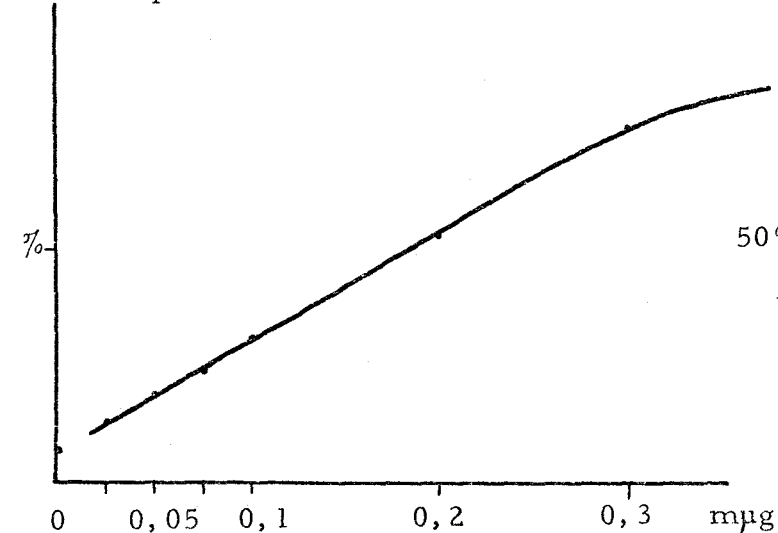
S: *Saccharomyces carlsbergensis* ATCC 9080
 M: Bacto-Pyridoxine Y Medium
 V: Pyridoxine hydrochloride NBC
 I: Bacto-Pyridoxine Y medium

lect. néph.

VITAMINE B₁₂

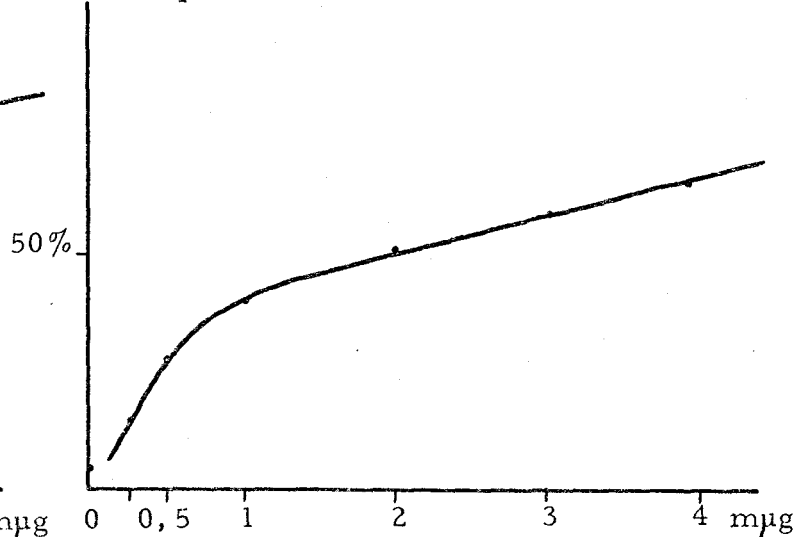
S: *Ochromonas malhamensis* ATCC 11532
 M: Bacto B₁₂ Ochromonas medium
 V: cyanocobalamine Merck
 I: Bacto B₁₂ Ochromonas medium
 † 0,2mµ/ml de B₁₂

lect. néph.

LEUCOVORINE

S: *Pediococcus cerevisiae* ATCC 8081
 M: CF Assay Medium
 V: Leucovorine (sel calcique) Lederle
 I: Bacto-Lactobacilli Broth AOAC

lect. néph.

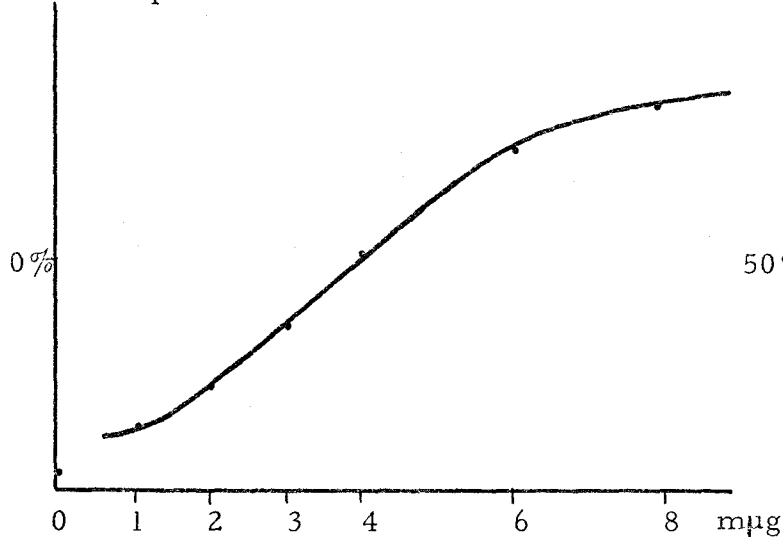
**COURBES D'ETALONNAGE POUR QUELQUES VITAMINES**

S=souche M=milieu de base V=origine de la vitamine I=inoculum

ACIDE FOLIQUE

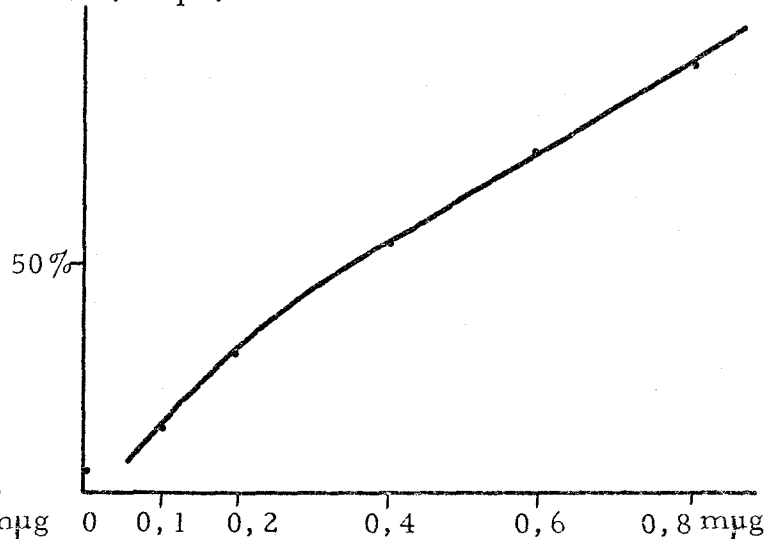
S: Streptococcus faecalis ATCC 8043
 M: Bacto-Folic Acid AOAC Medium
 V: Ac. pteroylglutamique NBC
 I: Bacto-Lactobacilli Broth AOAC

lect. néph.

ACIDE FOLIQUE

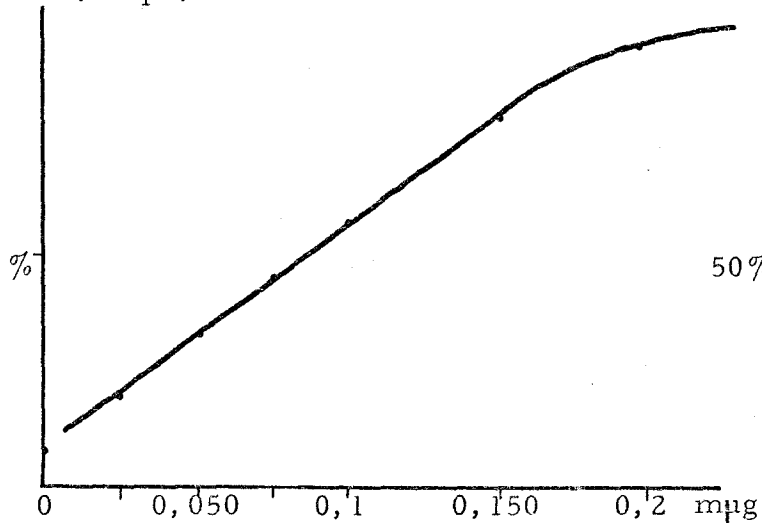
S: L. casei ATCC 7469
 M: Bacto-Folic Acid Casei Medium
 V: Ac. pteroylglutamique NBC
 I: Bacto-Lactobacilli Broth AOAC

lect. néph.

VITAMINE B₁₂

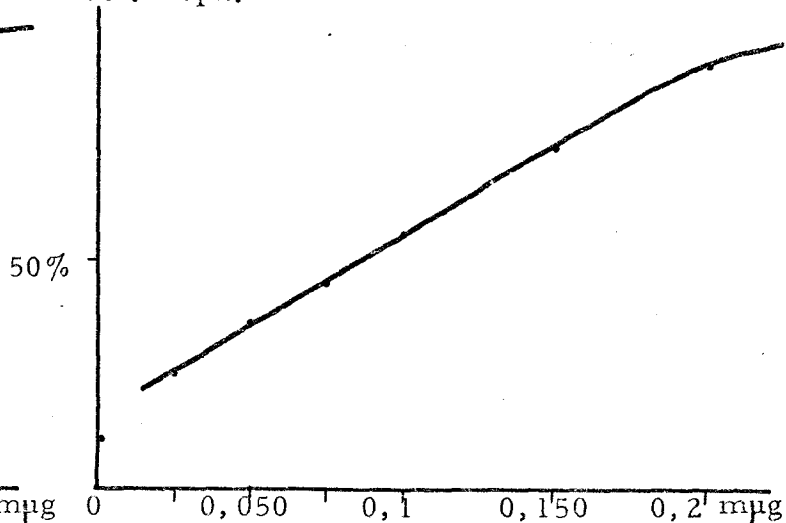
S: L. leichmannii ATCC 7830
 M: Bacto-B₁₂ Assay Medium USP
 V: Cyanocobalamine NBC
 I: Bacto-B₁₂ Inoculum Broth USP

lect. néph.

VITAMINE B₁₂

S: L. leichmannii ATCC 4797
 M: Bacto-Vitamine B₁₂ Assay Medium
 V: Cyanocobalamine NBC
 I: Bacto-B₁₂ Inoculum Broth USP

lect. néph.

**COURBES d'ETALONNAGE POUR QUELQUES VITAMINES**

S=souche

M=milieu de base

V=origine de la vitamine

I=inoculum

1^e PARTIE

LES SUBSTANCES ORGANIQUES ELIMINEES PAR

LE SYSTEME RADICULAIRE DES PLANTULES DE COLZA

ET LEUR EVOLUTION DANS LA RHIZOSPHERE

Pour analyser les caractéristiques microbiologiques de la rhizosphère et en étudier son rôle, thème principal du travail que nous voulions entreprendre, il fallait tout d'abord connaître la nature et l'importance relative des substances organiques émises par le système racinaire du Colza, puis étudier leur utilisation, comme source énergétique ou nutritionnelle, par la microflore rhizosphérique.

Nous considérerons donc successivement les exsudats racinaires des plantules de Colza cultivées en conditions stériles, puis l'évolution de certains composés organiques présents dans ces exsudats, les acides aminés et les vitamines hydrosolubles, quand la germination s'effectue en présence d'une microflore tellurique.

A - ETUDE PRELIMINAIRE : ELIMINATION DE SUBSTANCES ORGANIQUES PAR LE SYSTEME RADICULAIRE DES PLANTULES DE COLZA.

A priori, pour cette étude, nous avons éliminé l'analyse des substances minérales et des composés organiques assez particuliers pour nous limiter aux substances pouvant effectivement jouer un rôle important dans l'établissement de la microflore rhizosphérique c'est-à-dire : les sucres, les acides aminés, les acides organiques et les vitamines hydrosolubles.

Pour ces analyses préliminaires, nous avons employé la technique de culture des graines en tubes simples, l'élution des substances présentes dans le substrat de germination s'effectuant suivant une méthode qui sera décrite ultérieurement. Enfin, les graines de Colza utilisées correspondent à la variété "Valois" et ont été récoltées directement sur les plantes en prélevant les siliques.

1 - Oses, acides aminés et acides organiques :

Les résultats que nous avons obtenus ont été publiés (Bull. Soc. Bot. Nord Fr., 1965, 18). Signalons toutefois que le terme spermosphère employé parfois dans la rédaction de cette première publication, et dont nous avons défini le sens dans l'introduction de ce mémoire, ne sera plus employé par la suite. En effet, lorsque nous avons commencé ces analyses, nous pensions non seulement étudier la microflore rhizosphérique, mais aussi la microflore épiphytique des graines, à l'origine de l'établissement de la spermosphère. Par la suite, comme nous nous sommes rendu compte que le rôle de cette microflore présente naturellement sur le tégument des graines était pratiquement insignifiante, nous en avons abandonné l'étude.

**ELIMINATION DE SUBSTANCES ORGANIQUES
AU COURS DE LA GERMINATION DU COLZA
(*Brassica Napus oléifera*)**

— Oses, acides aminés, acides organiques

par R. BLONDEAU (*)

Ce travail entre dans le cadre de l'étude des relations existant entre les graines en germination et la microflore environnante.

En effet, si les interactions plantes-microorganismes au niveau de la « rhizosphère » sont actuellement assez connues, il n'en est pas de même pour les graines qui, apportant une microflore propre, des constituants organiques de surface et des exsudats, s'entourent d'une microflore tellurique particulière appelée « spermosphère ».

Nous commencerons donc cette étude en recherchant tout d'abord les substances qui, éliminées par les graines pendant la période de germination, sont susceptibles de provoquer une multiplication de microorganismes autour de la jeune plantule.

Après divers essais de mise en germination de semences, nous avons retenu la graine du colza (*Brassica Napus oléifera*) à partir de laquelle nous avons étudié l'élimination d'oses, acides aminés et acides organiques.

Nous préférons employer ce terme plus vague d'« élimination », ne sachant pas encore si le phénomène physiologique se rapportant à la sortie de ces différents produits est une sécrétion vraie (émission de substances) ou plutôt une excrétion (libération de déchets).

Les travaux effectués sur ce sujet sont peu nombreux. La cause principale semble d'ailleurs en être l'absence de techniques suffisamment précises pour mettre en évidence l'émission de ces substances organiques.

— Quelques auteurs signalent leur libération par les graines elles-mêmes ; citons GASSNER et FRANKE en 1935, BORNER en 1955 et 1956, LINSKENS et

(*) Séance du 12 mai 1965.

KNAPP en 1955, BARTON et MAC NAB en 1956, BELIKOV et KIRILLOVA en 1962. Par des dosages microbiologiques, PICCI en 1959 détermine aussi les quantités d'acides aminés émis par quelques graines. Enfin, récemment, AMOROS et DURAND ont dosé l'azote, les acides aminés et uréides glyoxyliques libérés par des graines de légumineuses.

— Les publications se rapportant à l'élimination de ces substances par les radicelles et racines sont plus nombreuses. Ce sont d'ailleurs les céréales qui ont surtout fait l'objet de telles études. Sur le maïs, signalons les travaux de KANDLER (1951), FRANK (1954), ARKAD'ÉVA (1963). Sur l'avoine, ceux de KATZNELSON, ROUATT et PAYNE (1955), PARKINSON (1955), ROVIRA (1956), MARTIN (1956). Sur le blé, ceux de RIVIÈRE (1960) et sur l'orge, ceux de ROVIRA (1956).

Les légumineuses ont aussi été souvent utilisées par les chercheurs : VIRTANEN, LAINE et HANSEN (1935 et 1936), LINSKENS et KNAPP (1955), ROVIRA (1956), PEARSON et PARKINSON (1961).

Parmi les autres plantes étudiées, mentionnons les recherches de BROWN, GREENWOOD et JOHNSON (1951), ANDAL, BHUVANESWARI et SUBBA-RAO (1956), BHUVANESWARI et SUBBA-RAO (1957), FRENZEL (1957), des Français DEHAY et CARÉ (1957, 1958, 1959), de KALYANASUNDARAM (1958). Plus récemment celles des Russes BELIKOV et KIRILLOVA (1960), KAZARJAN et KARAPETJAN (1961), et enfin celles de KOSSEY-FEJER (1961), SUBBA-RAO et BAILEY (1961), SULOCHANA (1962), RONECKLES et KROTKOV (1964).

TECHNIQUES DE CULTURE

Les graines de colza sont stérilisées par passage dans un bain d'hypochlorite de calcium pendant 20 minutes, suivi de trois lavages successifs dans l'eau stérile.

Les tubes de culture employés (4 × 15 cm) contiennent de la laine de verre surmontée du substrat constitué par 15 g de sable de Fontainebleau lavé aux acides. Le milieu nutritif utilisé est la solution de KNOP diluée de moitié à raison de 7,5 ml par tube.

La laine de verre permet ainsi de maintenir une humidité constante du substrat, sans qu'il y ait excès de liquide. Les tubes, après bouchage au coton, et le milieu nutritif, sont stérilisés séparément à l'autoclave.

Après ensemencement des graines, à raison de 25 par tube, ceux-ci sont recouverts d'un papier d'étain et placés pendant 24 heures à l'obscurité dans une étuve à 26° C. Les germinations sont ensuite soumises à une température de 18 à 20° C. avec 12 heures de lumière et 12 heures d'obscurité par jour. Enfin, un contrôle de stérilité des milieux nutritifs est effectué avant chaque analyse.

TECHNIQUES D'ANALYSE

a) Isolement des substances éliminées.

Nous avons effectué des analyses après 30 heures, 2 jours, 3, 5, 7, et 9 jours de culture. Elles portent à chaque fois sur 200 germinations, c'est-

à-dire 8 tubes de culture. Les plantules sont enlevées soigneusement du sable, et les racines sont rincées rapidement à l'eau bidistillée, en évitant l'immersion des feuilles.

Le sable et la laine de verre sont d'autre part lavés plusieurs fois à l'eau bidistillée, et les eaux de lavage des racines et du sable sont rassemblées (volume final d'environ 500 ml). Ce matériel est ensuite filtré avant purification et fractionnement sur colonnes de résines échangeuses d'ions.

b) Fractionnement des substances éliminées.

La déminéralisation des extraits est réalisée par un passage successif sur une colonne de résines à échange de cations (Dowex 50 × 8 mesh 25 — 50, forme acide), puis d'anions (Duolite A 40 — mesh 25 — 50, forme formiate). Cette technique introduite par Partridge, permet en outre de réaliser un fractionnement des constituants organiques en composés neutres, basiques, et acides. La « fraction neutre » représentée par le liquide effluent, contient en particulier les glucides. La « fraction basique » contient les acides aminés. Elle est obtenue par le passage d'une solution aqueuse d'ammoniaque à 5 % (v : v) sur la colonne échangeuse de cations. La « fraction acide » contient les acides organiques. Elle est obtenue par le passage d'une solution aqueuse d'acide formique à 11 % (v : v) sur la colonne échangeuse d'anions.

Chacune de ces trois fractions obtenues est ensuite concentrée sous vide à sec, puis reprise par 1 ou 2 ml d'eau distillée, avant analyse chromatographique.

c) Analyse chromatographique.

Dans chaque cas, nous avons utilisé la chromatographie descendante à la température de 20° C., avec le papier Whatman n° 1.

Nous avons employé la chromatographie monodimensionnelle pour l'étude des sucres et acides organiques, et la chromatographie bidimensionnelle pour les acides aminés.

— Etude des sucres :

Le système solvant employé est celui de PARTRIDGE : n-butanol-acide acétique-eau (40 : 10 : 50 v/v) et la méthode de révélation de GUSTAFSON, SUNDMAN et LINDH, au phtalate d'aniline (l'acide phtalique est dissout dans l'éluant, et après élution, quand le chromatogramme est sec, l'acide phtalique restant sur le papier, la révélation est poursuivie en plongeant le papier dans une solution étherée d'aniline fraîchement distillée).

Après passage des chromatogrammes à l'étuve 105° pendant 20 minutes, les aldoses et cétoles sont colorés du rose au brun.

— Etude des acides aminés :

En première dimension, le solvant utilisé est toujours celui de PARTRIDGE ; et en seconde dimension, c'est une solution aqueuse de phénol à 90 % (p:v) saturé d'eau, en atmosphère d'ammoniac et d'acide cyanhydrique. La révélation des chromatogrammes est obtenue par pulvérisation

d'une solution de ninhydrine, suivie d'un chauffage à 85° pendant 5 à 10 minutes.

— Etude des acides organiques :

Nous avons effectué, d'une part, des développements avec un solvant alcalin : l'éthanol ammoniacal (éthanol 20-NH₃ concentré 1-eau 4 v/v) et d'autre part des développements avec un solvant acide (butanol 10-acide formique 3-eau 10 v/v). Le révélateur employé est le mélange iodure-iodate de potassium.

RESULTATS

1) Elimination d'oses.

La séparation par chromatographie monodimensionnelle sur papier nous a permis d'identifier 2 sucres : le glucose et le fructose.

L'étude photométrique des spots obtenus, effectuée à l'aide du photovolt électronique densitometer, nous a donné des valeurs qui, rapportées à des courbes d'étalonnage, représentent la quantité de glucose ou de fructose libérés par les plantules.

Les résultats, exprimés en microgrammes par plante, sont rassemblés dans le tableau I.

ELIMINATION D'OSSES AU COURS DE LA GERMINATION DE LA GRAINE DU COLZA (en µg/plante)		
Temps de germination	GLUCOSE	FRUCTOSE
30 heures	0,4	0
2 jours	9,8	10,0
3 jours	12,3	11,6
5 jours	18,4	14,7
7 jours	20,8	17,6

TABLEAU I

Dans le cadre de nos expériences, nous constatons donc une élimination relativement très importante des sucres après deux jours de germination. Ce phénomène s'accroît ensuite progressivement jusqu'au septième jour. Notons aussi que les quantités de glucose et de fructose sont presque équivalentes.

2) Elimination d'acides aminés.

Nous avons pu identifier treize acides aminés dans les fractions basiques.

Après seulement trente heures de germination, seuls l'acide glutamique, l'alanine, l'arginine, et la glutamine sont décelables.

A partir du deuxième jour, apparaissent en plus l'acide aspartique, le glycolle, la leucine, la méthionine, la proline, la sérine, thréonine, la tyrosine et le tryptophane.

Le tableau II donne l'importance relative (+, ++, +++) de la surface des taches de chaque acide aminé trouvé.

IDENTIFICATION ET IMPORTANCE RELATIVE DES ACIDES AMINES ELIMINES AU COURS DE LA GERMINATION DE LA GRAINE DU COLZA						
	30 heures	2 jours	3 jours	5 jours	7 jours	9 jours
Ac. aspartique	—	+	++	++	++	++
Ac. glutamique	+	+++	+++	+++	+++	+++
Alanine	+	+++	+++	+++	+++	+++
Arginine	+	++	++	++	++	+++
Glutamine	+	++	++	++	+++	+++
Glycolle	—	+	+	+	+	++
Leucine	—	+	+	+	++	++
Méthionine	—	+	+	+	+	+
Sérine	—	+	++	++	+++	+++
Thréonine	—	+	+	+	+	++
Tyrosine	—	+	+	++	++	++
Proline	—	++	++	++	++	++
Tryptophane	—	++	++	++	++	++

TABLEAU II

Le tryptophane a été mis en évidence par le paradiméthylaminobenzaldéhyde (réactif d'EHRlich) ; la proline, par l'isatine ; et les autres acides par la ninhydrine.

Une étude semi-quantitative a été ensuite entreprise pour les principaux acides aminés : acide glutamique, alanine, arginine, glutamine et sérine. Pour cela, après révélation des chromatogrammes, les spots sont découpés et élués avec une solution à 0,1 % de chlorure de cadmium dans du méthanol à 40 %. Les absorbances des solutions obtenues sont ensuite déterminées au photocolorimètre ($\lambda = 575$) et comparées à celles d'un « témoin-papier » découpé à côté des taches à doser.

Les dosages sont effectués par rapport à des gammes étalons établies pour chaque acide aminé. Les résultats obtenus, rapportés à une plantule sont rassemblés dans le tableau III.

ELIMINATION D'ACIDES AMINES AU COURS DE LA GERMINATION DE LA GRAINE DU COLZA (en $\mu\text{g/plante}$)					
	2 jours	3 jours	5 jours	7 jours	9 jours
Acide glutamique	1,25	1,37	1,37	1,71	1,12
Alanine	0,40	0,42	0,62	0,76	0,84
Arginine	0,44	0,56	0,80	0,90	1,50
Glutamine	—	—	0,64	0,86	2,10
Serine	—	0,62	0,75	1,52	1,61

TABLEAU III

3) Elimination d'acides organiques.

Un seul acide organique a été caractérisé de façon constante dans nos cultures : l'acide malique. Il n'apparaît qu'après le deuxième jour de germination et a été constamment retrouvé jusqu'au neuvième jour.

La surface et l'intensité des taches obtenues après révélation à l'iodure-iodate de potassium, comparées à une gamme d'autres taches contenant des doses connues et croissantes d'acide malique, nous permet d'évaluer à environ 4 μg après 3 jours, et 6 à 7 μg après 5 jours, la quantité d'acide malique éliminée par une graine de colza.

DISCUSSION ET CONCLUSION

Ces résultats indiquent une élimination importante de sucres et d'acides aminés pendant la germination de la graine de colza.

Signalons qu'à propos des oses, nous obtenons, au point de vue quantitatif, des chiffres voisins de ceux que donne ROVIRA dans son étude des substances sécrétées par l'avoine et le pois. Celui-ci constate qu'après 14 jours de germination, 25 μg de glucose et autant de fructose sont libérés par le pois, alors qu'à pendant la germination du caryopse d'avoine, 20 μg de glucose et 17 μg de fructose sont rejetés pendant le même temps.

Cette présence de glucose et de fructose autour de la graine en germination représente une source énergétique indubitable qui doit stimuler la population microbienne du sol.

Parmi les acides aminés éliminés par le colza, nous retrouvons l'acide aspartique, l'acide glutamique, l'alanine, la leucine et la sérine souvent signalés dans la rhizosphère des végétaux.

La glutamine, que nous avons trouvée en forte proportion (2.1 µg par graine après 9 jours de germination), est cependant beaucoup moins fréquemment citée.

Insistons sur la présence de la méthionine, de l'alanine et de la proline, qui sont nécessaires à la croissance de nombreux germes du sol, ainsi que sur celle du tryptophane, précurseur de l'acide indole-acétique.

En règle générale, les acides aminés vont permettre la prolifération, autour de la plantule, de bactéries à pouvoir de synthèse faible.

Nous concluons cette étude en soulignant l'action primordiale que peuvent exercer ces substances organiques dans le sol, lors de l'établissement de la « spermosphère ».

REMERCIEMENTS

Nous remercions le Docteur J. Pochon, chef du service de Microbiologie du Sol à l'Institut Pasteur de Paris, qui nous a donné de précieux conseils.

BIBLIOGRAPHIE

- AMOROS M. et DURAND G. — 1964. Libération de diverses substances par des graines de légumineuses au cours de leur imbibition.
Ann. Inst. Pasteur, 107, 79-85.
- ANDAL R. K., BHUVANESWARI N. S. and SUBBA-RAO. — 1956. Roots exudates of paddy.
Nature, 178, 1063.
- ARKAD'eva Z. A. — 1963. Rapports entre le maïs et quelques bactéries de la microflore des racines (en Russe).
Mikrobiologija, S.S.S.R., 32, 79-85.
- BARTON L. V. and MAC NAB J. — 1956. Relation of different gases to the soaking injury of seeds - III. Some chemical aspects.
Contrib. Royce Thompson Inst., 18, 339-356.
- BELIKOV P. S., KIRILLOVA T. V. - 1960. Périodicité nyctémérale de l'activité de synthèse des racines (en Russe).
Izvest. timirjaz. selskokh. Akad. S.S.S.R., 5, 35-44.
- BELIKOV P. S., KIRILLOVA T. V. — 1962. Dynamique de l'excrétion de certaines substances par le coléoptile d'orge sous l'action de la chaleur (en Russe).
Izvest. timirjaz. selskokh. Akad. S.S.S.R., 6, 61-68.
- BHUVANESWARI K. and SUBBA-RAO N.S. — 1957. Root exudates in relation to the rhizosphere effect.
Proc. Ind. Acad. Sci., 45, 299-301.
- BORNER H. — 1955. Die Ausscheidung organischer Verbindungen aus den Samen von Roggen (*Secale cereale L.*), Weizen (*Triticum aestivum L.*) und Gerste (*Hordeum vulgare L.*) während der quellung.
Naturwiss., 42, 48.
- BORNER H. — 1956. Die Abgabe organischer Verbindungen aus den Karyopsen, Wurzeln und Ernterückständen von Roggen (*Secale cereale L.*), Weizen (*Triticum aestivum L.*) und Gerste (*Hordeum vulgare L.*) und ihre Bedeutung bei der gegenseitigen Beeinflussung der höheren.
Pflanzen, Beitr. Biol. Pflanz., 33, 33-83.

- BROWN R., GREENWOOD A. D., JOHNSON A. W. and LONG A. G. — 1951. The stimulant involved in the germination of *Orobancha minor*.
Biochem. J., 48, 559-564 et 564-568.
- CARRÉ M. — 1959. Contribution à l'étude des substances excrétées par les racines des végétaux supérieurs.
Thèse Doct. Pharm. Lille. Imprimerie Centrale.
- DEHAY C. et CARRÉ M. — 1957. Etude de la composition de quelques excrétiions radicellaires
C. R. Acad. Sci., 244, 230-233.
- DEHAY C. et CARRÉ M. — 1958. Etude de la composition des excrétiions radicellaires chez quelques légumineuses d'origine africaine.
C. R. Acad. Sci., 247, 336-338.
- FRANK H. — 1954. Über den Stickstoffverlust bei alternden Pflanzen.
Planta, 44, 319-340.
- FRENZEL B. — 1957. Zur Abgabe von Aminosäuren und Amidn an das Nährmedium durch die Wurzeln von *Helianthus annuus*.
Planta, 49, 210-234.
- GASSNER G. und FRANKE W. — 1935. Einige Versuche über den Stickstoffhaushalt lichtkeimender Samen im dunklen Keimbett.
Zu. Botan., 28, 446-463.
- KALYANASUNDARAM R. — 1958. Production of fusaric acid by *Fusarium lycopersici* Sacc. in the rhizosphere of tomato plant.
Phytopathol. Zeits, 32, 25-34.
- KANDLER O. — 1951. Papierchromatographischer Nachweis Aminosäureausscheidung in-vitro kultivierte Maiswurzeln.
Zeitsch. Naturfor., 66, 437-444.
- KATZNELSON H., ROUATT J. W. and PAYNE T.M.B. — 1955. The libération of amino-acids and reducing compounds by plant roots.
Plant and soil, 7, 35-38.
- KAZARIAN V. O., KARAPETJAN K. A. — 1961. Sur l'élimination d'acides aminés par les racines de végétaux (en Russe).
Akad. Nank. arm. S.S.S.R., 32, 159-162.
- KOSSEY-FEJER O. — 1961. Gehalt der Wurzel von Keimpflanzen an freiem Methionin.
Naturwissenschaften Dtsch., 48, 410-411.
- LINSKENS H. F. und KNAPP R. — 1955. Über die Ausscheidung von Aminosäuren in reinen und gemischten Beständen verschiedener Pflanzenarten.
Planta, 45, 106-117.
- MARTIN P. — 1956. Qualitative und quantitative Untersuchungen über die Ausscheidung organischer Verbindungen aus den Keimwurzeln des Hafers (*Avena sativa* L.).
Naturwiss. 43, 227-228.
- PARKINSON D. — 1955. Liberation of amino-acids by oat seedlings.
Nature, 176, 35-36.
- PEARSON R. and PARKINSON D. — 1961. The site of excretion of ninhydrine - positive substances by broad-bean seedlings.
Plant and soil, 13, 391-396.
- PICCI G. — 1959. Dosaggio microbiologico di alcune vitamine e di alcun aminoacidi ceduti dal seme durante la germinazione.
Ann. Fac Agrar. Univ. Pisa., 20, 51-60.
- RIVIÈRE J. — 1960. Etude microbiologique de la rhizosphère du blé. III. Nature des excrétiions radicellaires du blé à la fin du tallage.
Ann. Inst. Pasteur, 98, 313-316.
- ROVIRA A. D. — 1956. Plant root excretions in relation to the rhizosphere effect.
Plant and soil, 7, 178-194.

- SLANKIS V., RONECKLES V. C. and KROTKOV G. — 1964. Metabolites liberated by
Roots of White Pine (*Pinus strobus* L.) Seedlings.
Physiol. Plant, 17, 301-313.
- SUBBA-RAO N. S. and BAILEY D. L. — 1961. Rhizosphere studies in relation to
varietal resistance of susceptibility of tomato to *Verticillium* wilt.
Can. J. Bot., 39, 1747-1758.
- SULOCHANA G. B. — 1962. Amino acids in root exudates of cotton.
Plant and soil, 16, 312-326.
- VIRTANEN A. I., LAINE T. and HANSEN S. — 1936. Excretion of amino-acids from the
roots nodules of leguminous plants.
Nature, 197, 277.
- VIRTANEN A. I. and LAINE T. — 1935. Chemical nature of the amino-acids excreted
by leguminous root nodules.
Nature, 136, 756-757.

2 - Vitamines du groupe B :

L'étude de l'élimination de ces vitamines hydrosolubles par le Colza a été publiée (Bull. Soc. Bot. Nord Fr., 1966, 19), mais pour la bonne compréhension de la suite des expériences, nous avons préféré ne pas inclure la publication, mais reprendre uniquement les résultats qui nous intéressent pour l'instant.

Les premiers travaux relatifs à la présence de ces facteurs de croissance dans les exsudats de graines en germination ou de plantules cultivées aseptiquement sont ceux de WEST (1939), qui identifie la thiamine et la biotine dans les sécrétions du lin. Cependant, la validité de sa méthode de dosage ayant été contestée, la poursuite des recherches dans cette voie n'a été reprise qu'en 1956, par BHUVANESWARI et SULOCHANA, qui, d'ailleurs, ne donnent que des résultats globaux, sans faire de distinction entre les différentes vitamines décelées. Des recherches plus récentes ont cependant prouvé que leur présence ne pouvait plus être mise en doute. En ce qui nous concerne, il était donc très intéressant d'en rechercher la teneur dans le milieu de culture de plantules de Colza cultivées aseptiquement.

a) Techniques d'analyse :

Pour la culture des plantules et la récupération des excrétats, la technique est identique à celle qui a été employée précédemment. La solution recueillie, finalement concentrée à un volume tel que 1 ml corresponde aux excrétats de 5 plantules, est stérilisée sur filtre Millipore (0,45 μ).

Pour l'analyse des vitamines, nous avons employé une méthode microbiologique simple, basée sur l'emploi de souches test sélectionnées par COOK et LOCHHEAD (1959), qui nous ont été transmises par le Service de Microbiologie du Sol de l'Institut Pasteur de Paris. Ces bactéries offrent l'avantage de se développer dans un milieu nutritif simple contenant :

- des sels minéraux : pour 1.000 ml d'eau distillée :

K_2HPO_4 : 1 g ; KNO_3 : 0,5 g ; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$: 0,2 g ; $CaCl_2$: 0,1 g ;
 $NaCl$: 0,1 g ; $FeCl_3 \cdot 6H_2O$: 0,01 g. Cette solution est ajustée au pH 6,8 portée à ébullition et filtrée après refroidissement.

- du glucose : 1 g par litre.

- des acides aminés : 1g par litre de "Casamino-acids vitamin free" (Difco)
- certains facteurs de croissance, variables suivant le microorganisme utilisé, indiqués dans le tableau I qui suit.

Ce milieu de culture est réparti dans des ballons de 100 ml, à raison de 40 ml par ballon.

Les solutions de facteurs de croissance sont préparées aux doses respectives de 50 µg pour la thiamine, la pyridoxine, le pantothénate de calcium, l'acide nicotinique ; de 10 µg pour l'acide folique ; de 0,2 µg pour la vitamine B₁₂ ; de 0,1 µg pour la biotine ; doses que l'on dissout respectivement dans 100 ml d'eau distillée. Chacune de ces solutions est stérilisée, puis répartie à raison de 1 ml par flacon où le facteur est nécessaire.

Pour mettre en évidence la présence d'une vitamine, on dispose : d'un témoin "négatif" contenant le milieu de culture complet sauf la vitamine à caractériser, dans lequel la souche ne peut proliférer ; d'un témoin "positif" contenant cette vitamine et dans lequel la souche prolifère ; et enfin de plusieurs flacons contenant le milieu de base plus 1 ml de filtrat à tester. Dans ce milieu la souche ne prolifèrera que si la vitamine est présente dans le filtrat.

SOUCHES TEST	VITAMINE RECHERCHEE	Composition du milieu de culture « témoin négatif » (en plus des sels et du glucose)
824 (Arthrobacter sp.) ..	Thiamine	« Casamino acids »
54 (Micrococcus sp.)	Biotine	« Casamino acids » Thiamine Vitamine B ₁₂
S101 (Flavobacterium sp.)	Ac. pantothénique	« Casamino acids » Thiamine Biotine
Ci3	Ac. nicotinique	« Casamino acids » Thiamine Biotine Pantothénate de Ca Ac. folique
GR28 (Agrobacterium sp.)	Ac. folique	« Casamino acids » Thiamine Biotine Ac. nicotinique Pantothénate de Ca
GR94	Pyridoxine	« Casamino acids » Thiamine Biotine Pantothénate de Ca Ac. folique Ac. nicotinique
539	Vitamine B ₁₂	Extrait de levure

TABLEAU I

Souches test utilisées pour la détection des facteurs de croissance

Pour les dosages quantitatifs, en plus du témoin "négatif" et "positif" on dispose d'une série de flacons recevant des doses croissantes de vitamine pure, qui donnera après inoculation et incubation, la courbe étalon de dosage et d'une série de flacons recevant des volumes décroissants de filtrat à étudier respectivement 1 ml ; 0,8 ml ; 0,6 ml ; 0,4 ml et 0,2 ml.

Enfin chaque flacon est amené à un volume égal de milieu de culture et toutes les expériences sont conduites en double. L'inoculum est préparé à partir d'un milieu de culture contenant une concentration suffisamment faible de la vitamine testée pour que celle-ci soit totalement utilisée pendant l'incubation. Après inoculation, les milieux sont portés à l'étuve 28°C pendant 5 jours, et la lecture des résultats se fait par turbidimétrie.

Cette technique permet de déceler jusqu'à 5 µg de thiamine, 0,1 µg de biotine et 1 µg d'acide folique présent dans la prise d'essai.

b) Résultats :

Cette méthode nous a permis d'identifier la présence de thiamine, biotine, acide pantothénique, acide nicotinique et acide folique dans le milieu de culture stérile, après 5 et 9 jours de germination (Tableau II). Par contre, après 3 jours, trois vitamines seulement parmi celles qui étaient recherchées ont pu être mises en évidence de façon certaine : la thiamine, la biotine et l'acide pantothénique. Quant à la pyridoxine et à la vitamine B₁₂, elles n'ont jamais été détectées.

VITAMINES	TEMPS DE GERMINATION		
	3 jours	5 jours	9 jours
Thiamine	+	+	+
Biotine	+	+	+
Ac. pantothénique	+	+	+
Ac. nicotinique	traces	+	+
Ac. folique	traces	+	+
Pyridoxine	0	0	0
Vitamine B ₁₂	0	0	0

TABLEAU II.

Présence de vitamines dans les exsudats du Colza cultivé stérilement.

Nous avons ensuite essayé de donner une valeur quantitative pour la thiamine, la biotine et l'acide folique. Les résultats sont rassemblés dans le tableau III. Remarquons que le taux de ces vitamines évolue de façon différente en fonction du temps de germination des graines de Colza. En particulier pour la thiamine, si la concentration est relativement élevée après 3 jours de germination, elle augmente ensuite très peu.

Temps de germination	Thiamine (en $\mu\text{g/g}$ de graine)	Biotine (en $\text{m}\mu\text{g/g}$ de graine)	Acide folique (en $\mu\text{g/g}$ de graine)
3 jours	0,57	5,2	traces
5 jours	0,60	15,6	0,59
9 jours	0,67	12,8	0,70

TABLEAU III.

Etude quantitative de l'élimination de quelques vitamines pendant la germination du Colza
(les résultats sont exprimés en μg ou en $\text{m}\mu\text{g}$ par g. de graines ensemencées).

c) Discussion et conclusion :

Nous avons prouvé la présence de 5 vitamines du groupe B dans les sécrétions des jeunes plantules de Colza. La recherche de la pyridoxine et de la vitamine B₁₂ a conduit à un résultat négatif qui peut être imputable, d'ailleurs à une sensibilité insuffisante des souches employées. Ces vitamines, et plus spécialement la thiamine et la biotine, peuvent jouer un rôle important dans la rhizosphère car de nombreux germes sont exigeants vis-à-vis de ces facteurs.

B - CINETIQUE DE L'EVOLUTION DES ACIDES AMINES ET VITAMINES
HYDROSOLUBLES DANS LA RHIZOSPHERE.

Notre étude portant sur l'évolution des substances organiques éliminée en présence d'une microflore, dans le milieu de culture, par les plantules de Colza, s'est limité aux acides aminés et vitamines du groupe B. En effet, les acides organiques, et plus précisément l'acide malique présent dans les exsudats, n'offrent, en tant que substances énergétiques ou nutritionnelles, qu'un intérêt mineur sur le plan microbiologique. Par contre, les sucres, et particulièrement le glucose, représentent une source énergétique très appréciable pour la microflore tellurique, mais non sélective vis-à-vis des groupements microbiens présents. Comme une étude précise, entreprise par KUNC et MACURA (1965), a permis de mettre en évidence leur utilisation dans des sols rhizosphériques, nous n'avons pas cru indispensable de reprendre ce problème.

Pour suivre cette évolution des acides aminés et vitamines dans la rhizosphère du colza, nous avons préféré ne pas utiliser la terre elle-même comme substrat de culture et source de microflore, mais toujours notre système de culture sur sable en tubes, en y incorporant, avant l'ensemencement des graines ou après le début de la germination suivant le cas, une suspension de terre préparée suivant une méthodologie précisée dans le premier chapitre de ce mémoire.

Afin d'éliminer de cette microflore totale la présence des champignons et même des actinomycétales, nous avons essayé plusieurs techniques : la filtration sur membranes ou sur divers substrats, la centrifugation ou la sédimentation, mais nous n'avons jamais pu aboutir à l'obtention d'une microflore purement bactérienne.

Les résultats obtenus ont été publiés aux Comptes Rendus (1968, 66). A la suite de ce travail, nous avons précisé l'importance de la biosynthèse de certaines vitamines par les bactéries rhizosphériques, et les nouveaux résultats ont été publiés dans les Annales de l'Institut Pasteur de Lille (1969 - 20).

MICROBIOLOGIE DU SOL. — *Cinétique de l'évolution des acides aminés et des vitamines hydrosolubles dans la rhizosphère des plantules de Colza (Brassica Napus oleifera)*. Note (*) de M. Roland Blondeau, présentée par M. Roger Heim.

Dans la rhizosphère de la plantule de Colza, la microflore tellurique utilise les acides aminés libérés par le système racinaire. Par contre, elle synthétise certaines vitamines hydrosolubles : acide folique et acide pantothénique en particulier, dans nos conditions expérimentales.

En culture stérile, les graines en voie de germination et le système racinaire des jeunes plantules éliminent des acides aminés et des vitamines hydrosolubles. L'excrétion de ces acides aminés a déjà donné lieu à de nombreux résultats [(¹) à (⁵)], alors que la présence des vitamines dans les exsudats a été peu recherchée, probablement à cause de la difficulté du dosage [(⁶), (⁷)].

En présence d'une microflore tellurique, l'utilisation de ces facteurs de croissance par les bactéries n'a jamais été étudiée de façon très précise. Dans une Note antérieure, nous avons signalé que les excréments radicellaires du Colza (⁸) stimulaient préférentiellement les bactéries ne nécessitant que des acides aminés pour leur biosynthèse, au détriment de celles qui avaient un pouvoir de synthèse plus réduit.

Ici, nous nous sommes proposé d'étudier simultanément la cinétique de l'évolution des acides aminés et des vitamines du groupe B au cours de la germination du Colza, comparativement en culture stérile, ou en présence d'une microflore tellurique. Parallèlement, nous avons aussi suivi l'activité biologique de cette microflore en évaluant le nombre de bactéries présentes en fonction du temps de germination.

MATÉRIEL ET TECHNIQUES. — Les tubes de culture employés contiennent de la laine de verre supportant le substrat de germination : du sable de Fontainebleau lavé aux acides. La solution de Knop diluée au demi constitue le milieu nutritif. Chaque tube reçoit, en plus, 1 ml d'une suspension dilution d'une terre de référence (⁹) diluée au 1/100 ; stérile ou pas, suivant le cas. Les graines de Colza utilisées (variété Crésus) sont préalablement stérilisées à l'hypochlorite de calcium. Elles sont semées à raison de 25 par tube, et les semis, disposés dans une pièce régulée à 22 °C, sont soumis à un éclairage de 12 h par jour.

A intervalles de temps réguliers, et après vérification éventuelle de la stérilité des tubes, les semis sont élués avec de l'eau bidistillée. Les éluats, passés sur filtres « Millipore » à porosité de 0,45 μ , sont ensuite concentrés sous vide jusqu'à un volume tel que 1 ml corresponde aux excréments de 2 plantules.

Ce volume est alors divisé en 2 fractions : la première, après congélation, est stérilisée par filtration ; elle sera destinée aux dosages vitaminiques. La seconde est utilisée pour le dosage des acides aminés, après passage sur résine Dowex 50 (forme acide), élution avec une solution ammoniacale, suivie d'une concentration et d'une lyophilisation.

(2)

Les vitamines hydrosolubles sont dosées par une méthode microbiologique :

Lactobacillus viridescens ATCC 12706 a été utilisé pour la thiamine.

Streptococcus faecalis ATCC 8043 a été utilisé pour l'acide folique.

Lactobacillus plantarum ATCC 8014 a été utilisé pour la biotine, l'acide nicotinique et l'acide pantothénique.

La lecture des résultats se fait par néphélométrie. Les cultures étant exposées à la lumière, la riboflavine et la pyridoxine n'ont pas été étudiées. Les acides aminés sont caractérisés par chromatographie sur plaques de cellulose, ou dosés par chromatographie sur colonne (appareil Technicon) (10). La microflore des tubes non stériles est évaluée par ensemencement sur milieu gélosé de Bunt et Rovira.

RÉSULTATS. — L'analyse chromatographique des acides aminés sur colonne a permis d'en identifier 24. Les tableaux I et I' groupent les résultats obtenus avec ceux qui sont le plus abondamment excrétés. Ces 10 acides aminés représentent 82 % du total, après 6 jours de germination en conditions stériles.

TABLEAU I

*Cinétique de l'évolution des principaux acides aminés dans les semis stériles (ST)
ou en présence d'une microflore tellurique (MT)*

(exprimée en 10^{-3} μ moles par plantule)

		3 jours	6 jours	9 jours
Acide aspartique	ST	1,05	1,77	3,50
	MT	0,64	0,24	0,21
Thréonine	ST	0,50	0,52	0,65
	MT	0,51	0,12	0,09
Sérine	ST	1,60	1,43	1,73
	MT	1,57	0,55	0,82
Acide glutamique	ST	1,85	2,11	2,50
	MT	1,25	0,15	0,13
Proline.....	ST	0,64	0,59	0,54
	MT	0,48	0,09	traces
Glycocolle.....	ST	1,01	1,04	1,10
	MT	0,83	0,52	0,44
α Alanine.....	ST	1,10	0,95	0,95
	MT	1,13	0,24	0,51
Valine	ST	0,48	0,61	0,70
	MT	0,35	0,10	0,08
Leucine	ST	0,39	0,48	0,44
	MT	0,24	0,07	0,07
Histidine	ST	0,57	0,81	0,76
	MT	0,65	0,34	0,29

(3)

TABLEAU I'

Acides aminés libérés après 6 jours de germination dans les semis stériles ;
et degré d'utilisation de chacun d'eux par la microflore tellurique

	% par rapport aux acides aminés totaux	% utilisé par la microflore
Acide aspartique	14	86,5
Thréonine	4,1	77
Sérine	11,4	61,6
Acide glutamique	16,7	92,9
Proline	4,7	84,8
Glycocolle	8,3	50
α Alanine	7,5	74,8
Valine	4,9	83,7
Leucine	3,9	85,5
Histidine	6,5	58,1

Le tableau II correspond aux dosages vitaminiques réalisés parallèlement.

TABLEAU II

Cinétique de l'évolution des vitamines hydrosolubles
(exprimée en μ g par plantule)

		3 jours	6 jours	9 jours	12 jours	15 jours
Biotine	ST	0,013	0,023	0,041	0,062	0,067
	MT	0,012	0,015	0,024	0,033	0,035
Acide folique	ST	0,28	0,55	0,62	0,65	0,72
	MT	0,48	0,94	1,12	0,98	0,81
Acide nicotinique	ST	11	14,5	17,5	26	23,5
	MT	10	11,5	6,5	8,2	12
Acide pantothénique	ST	7	14,3	20,8	23,1	27,2
	MT	12,1	16,4	22	19,3	13,4
Thiamine	ST	0,20	0,24	0,27	0,29	0,30
	MT	0,19	0,23	0,24	0,24	0,25

Enfin, le tableau III correspond à l'évolution de la microflore tellurique ensemencée dans les tubes de culture. Les résultats sont donnés en milliers de germes présents dans 1 ml de milieu de culture.

TABLEAU III

Jours	Nombre de bactéries (en milliers)	Taux de crois- sance par jour
0	2,8	—
1	26,8	8,5
2	192	6,1
3	16 040	82,5
4	144 500	8
5	157 600	0,09
6	196 000	0,24
9	312 000	—
12	386 000	—
15	530 000	—
18	525 000	—

(4)

INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS. — La cinétique de l'élimination des acides aminés par les plantules stériles varie suivant leur nature. Ainsi, pour l'acide aspartique, la quantité dosée est proportionnelle à la durée de germination (tout au moins dans les limites de l'expérience). A un moindre degré, on retrouve la même cinétique pour la thréonine, l'acide glutamique, la valine et la leucine. Par contre, le taux des autres acides aminés varie peu après 3 jours de germination, ou peut même diminuer.

En présence d'une microflore tellurique, la concentration des 24 acides aminés identifiés a toujours été plus faible que dans les semis stériles. Tous paraissent être utilisés par les bactéries (tableau I'). De plus, l'acide aspartique, l'acide glutamique et la leucine sont préférentiellement assimilés dès le début de la germination, ainsi que l'asparagine, l'isoleucine, et la lysine (non représentés dans le tableau).

Dans les semis stériles, l'élimination des vitamines du groupe B est aussi proportionnelle au temps de germination, quelle que soit la vitamine considérée. Cependant, en présence de la microflore tellurique, s'il y a utilisation de la biotine et de l'acide nicotinique, il y a par contre augmentation considérable du taux d'acide folique, et, à un moindre degré, de celui de l'acide pantothénique. Quant à la thiamine, sa teneur dans la rhizosphère n'est pratiquement pas modifiée.

L'acide folique et l'acide pantothénique seraient donc synthétisés par les bactéries rhizosphériques. La production est d'ailleurs en rapport avec leur taux de multiplication (tableau III). Elle est active pendant les premiers jours de germination, puis la concentration diminue, pour une raison encore indéterminée.

En conclusion, dès le début de la croissance des plantules de Colza, le taux des acides aminés et des vitamines hydrosolubles varie dans le même sens si les semis sont stériles. En présence d'une microflore, il y a diminution de tous les acides aminés, mais biosynthèse de certaines vitamines.

(*) Séance du 22 avril 1968.

(1) C. B. SULOCHANA, *Plant and Soil*, 16, 1962, p. 312.

(2) V. VANCURA et A. HOVADIK, *Plant microbes relationships, Proc. Symp.*, Prague, 1963.

(3) V. SLANKIS, V. C. RONECKLES et G. KROTKOV, *Plant and Soil*, 17, 1964, p. 301.

(4) A. CHALVIGNAC, *Thèse Sc.*, Paris, 1965.

(5) D. BOULTER, J. J. JEREMY et M. WILDING, *Plant and Soil*, 24, 1966, p. 121.

(6) A. D. ROVIRA et J. R. HARRIS, *Plant and Soil*, 14, 1961, p. 199.

(7) C. B. SULOCHANA, *Plant and Soil*, 16, 1962, p. 327.

(8) R. BLONDEAU, *Bull. Soc. Bot. Nord Fr.*, 19, 1966, p. 27.

(9) R. BLONDEAU, *Bull. Soc. Bot. Nord Fr.*, 21, 1968 (sous presse).

(10) Analyses réalisées au laboratoire de Physiologie végétale de l'Institut catholique de Toulouse.

(Laboratoire de Cryptogamie, Faculté des Sciences,
B. P. n° 36, Lille, Nord.)

SPÉCIFICITÉ DE LA BIOSYNTHÈSE DE CERTAINS FACTEURS
VITAMINIQUES DANS LA RHIZOSPHERE DES PLANTULES DE COLZA
(*BRASSICA NAPUS OLEIFERA*)

BLONDEAU R.

(Laboratoire de Cryptogamie - Faculté des Sciences de Lille)

Dans les semis de colza effectués en présence d'une microflore tellurique donnée, certaines vitamines hydrosolubles semblent être synthétisées dans le substrat de germination. On peut se demander si ces biosynthèses apparentes sont, soit fonction de la nature des microflores telluriques introduites, soit des plantules elles-mêmes, par l'intermédiaire de leurs excréments.

Dans une note précédente, nous avons signalé la présence d'une biosynthèse de certaines vitamines hydrosolubles, en particulier de l'acide folique et de l'acide pantothénique, dans la rhizosphère de la plantule de colza. Ce résultat ayant été obtenu à partir d'une seule origine de microflore tellurique, nous avons voulu préciser les facteurs conditionnant cette synthèse en cultivant les plantules en présence de plusieurs microflores de nature différente. En outre la présence de vitamine B₆, de riboflavine et de vitamine B₁₂, qui n'avait jamais été détectée dans la rhizosphère du colza, a aussi été recherchée.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

La technique de culture des graines, ainsi que le mode de préparation et d'incorporation des microflores telluriques ont déjà été précisés (3). Une petite modification a cependant été apportée aux tubes de culture : la partie inférieure de ceux-ci, correspondant à la hauteur du substrat de germination, est placée dans l'obscurité, en vue d'éviter la photolyse des vitamines photosensibles, et permettant ainsi leur dosage ultérieur.

Ce substrat de germination est constitué par du sable de Fontainebleau lavé aux acides. La solution de Knop diluée au demi est employée comme milieu nutritif. Avant ensemencement, les graines de colza, de variété Crésus, sont stéri-

lisées par passage dans un bain d'hypochlorite de calcium, suivi de 5 lavages à l'eau stérile. Enfin, les semis sont disposés dans une pièce régulée à 18 °C, et reçoivent un éclairage de 12 h par jour.

Les microflores telluriques employées correspondent à des terres de texture et de composition très variées. Le tableau I résume l'origine des cinq microflores utilisées, et précise l'importance de la population bactérienne présente, évaluée par ensemencement sur milieu gélifié de BUNT et ROVIRA (4).

TABLEAU I

Microflores telluriques	A	J	P	O	F
Origine	Terre momentanément inculte	Terre de jardin très riche en humus	Terre de prairie	Terre de culture à pH acide	Terre de culture à pH basique
Nombre de bactéries en millions/g de terre	64,330	80,750	19,400	50,500	36,500

Les vitamines sont dosées par une méthode microbiologique :

Streptococcus faecalis ATCC 8043 permet le dosage de l'acide folique ;

Lactobacillus plantarum ATCC 8014, celui de l'acide pantothénique, l'acide nicotinique et la biotine ;

Lactobacillus viridescens ATCC 12706, celui de la thiamine ;

Lactobacillus casei ATCC 7469, celui de la riboflavine ;

Lactobacillus leichmannii ATCC 7830, celui de la vitamine B₁₂ ;

Saccharomyces carlsbergensis ATCC 9080, celui de la vitamine B₆ (l'ensemble pyridoxine, pyridoxal et pyridoxamine).

La lecture des résultats se fait par néphélométrie.

RÉSULTATS

L'éluotion des substrats de germination a été effectuée après 6 jours de culture, c'est-à-dire à un moment où, dans le substrat de germination, la différence entre les concentrations vitaminiques d'origine bactérienne et végétale est suffisamment élevée, comme nous l'avons déjà signalé (2).

Les éluats sont ensuite concentrés sous vide jusqu'à un volume tel que 1 ml corresponde aux excréats de 2 plantules, et sont finalement passés sur filtres « Millipore » (porosité 0,45 μ).

Les résultats, rassemblés dans le tableau II sont donnés en 10⁻³ μ g et correspondent à une plantule. La première colonne de résultats donne les concentrations obtenues à partir de semis stériles, correspondant donc aux excréats radicellaires seuls (l'auto apport vitaminique relevant de l'introduction des microflores dans les tubes de culture s'est révélé insignifiant).

Il ressort de ces résultats que 2 vitamines : l'acide folique et la vitamine B₁₂ sont toujours retrouvés à des doses plus élevées lorsque les semis sont effectués

TABLEAU II

Concentration en facteurs de croissance des substrats de germination inoculés par diverses microflores telluriques

Microflores telluriques :		A	J	P	O	F
Acide folique	0,65	1,48	0,74	1,61	0,82	2,61
Acide pantothénique	13,6	8,2	10,3	10,4	10,4	9,6
Acide nicotinique	16,1	10,9	7,8	13,8	8,2	14
Thiamine	0,19	0,17	0,14	0,12	0,41	0,12
Biotine	0,031	0,025	0,032	0,031	0,032	0,035
Vitamine B ₆	0,20	0,26	0,20	0,47	0,48	0,53
Riboflavine.....	<0,0012	<0,0012	<0,0012	<0,0012	<0,0012	<0,0012
Vitamine B ₁₂	0,0041	0,0110	0,0083	0,0052	0,0087	0,0115

en présence d'une microflore. La vitamine B₆, à une exception près est, elle aussi, plus concentrée dans les éluats non stériles.

Ces 3 vitamines semblent donc être synthétisées par la microflore rhizosphérique, indépendamment de la composition de la microflore introduite dans les semis.

Les autres vitamines : acide pantothénique, acide nicotinique, thiamine et biotine sont, par contre, presque toujours utilisées par la microflore, sauf dans quelques cas : en particulier celui de la thiamine, en présence de la microflore O, et de la biotine, en présence de microflore F. Leur synthèse serait donc uniquement fonction du spectre bactérien de la microflore tellurique introduite dans les cultures.

Enfin, en ce qui concerne la riboflavine, elle n'a jamais pu être mise en évidence. La technique utilisée permettait pourtant de déceler une concentration correspondant à 1,2 µg par plantule. Ce résultat est en accord avec ceux de ROVIRA et HARRIS (9) qui ne trouvent la riboflavine qu'à l'état de traces, et dans certains exsudats radicellaires seulement. Par contre, CHALVIGNAC (5) en détecte dans les exsudats de plantules de lin, et PICCI (8) dans la spermosphère de quelques graines (Trigonelle, moutarde et navet).

DISCUSSION

La synthèse apparente d'acide folique, de vitamine B₆ et B₁₂, par la microflore rhizosphérique devait cependant être vérifiée de façon plus précise. En effet, elle pouvait être imputée à l'activité d'une même flore bactérienne se développant dans toutes les terres au moment de leur conditionnement (séchage ou conservation). Une nouvelle expérience a ainsi été entreprise à partir d'une terre non séchée, employée comme source de microflore.

Cette terre, prélevée au même endroit que la terre F, a donné exactement les mêmes résultats, c'est-à-dire la présence, après 6 jours de germination d'environ 4 fois plus d'acide folique, et plus de 2 fois plus de vitamine B₆ et B₁₂ dans les semis non stériles.

Cette élévation de la concentration en facteurs de croissance pouvait de même être interprétée par la multiplication d'une microflore, indépendante des

excrétats racinaires, se développant uniformément dans les tubes de culture avant l'implantation de la racine dans le substrat de germination.

Pour éliminer cette hypothèse, nous avons dosé la concentration d'acide folique présent dans les éluats des tubes de culture suivants :

- tubes stériles nonensemencés (T) ;
- tubesensemencés avec une microflore A seule (MT) ;
- tubes stérilesensemencés avec des graines seules (STC) ;
- tubesensemencés avec des graines, en présence de la microflore A (MT₀C) ;
- tubes stérilesensemencés d'abord avec des graines, puis, après 72 heures de germination, inoculés avec la microflore A (MT₃C).

Les résultats, obtenus après 8 jours de germination (tableau III) permettent effectivement de rejeter cette hypothèse.

TABLEAU III

Acide folique :	T	MT	STC	MT ₀ C	MT ₃ C
(en 10 ⁻³ µg/tube de culture)	0	1,92	13 21	30,36	28,93

Enfin à propos des trois facteurs de croissance : acide folique, vitamine B₆ et B₁₂, soulignons que dans l'état actuel de notre expérimentation, on ne peut pas encore affirmer qu'il y a biosynthèse de vitamines proprement dites par la microflore rhizosphérique.

En effet, on ne détecte finalement ces biosynthèses de facteur de croissance qu'en fonction des souches tests utilisées : or, *Streptococcus faecalis*, qui répond à la présence d'acide folique (acide ptéroylglutamique) et de quelques dérivés tels que l'acide ptéroïque et la rhizoptérine, n'est que très peu stimulé par les formes polyglutamiques de cet acide folique. Dans nos semis, nous ne connaissons pas la forme présente.

Saccharomyces carlsbergensis répond aux trois formes de la vitamine B₆ : pyridoxine pyridoxal et pyridoxamine, mais ne peut renseigner sur l'importance relative de chacune de ces formes dont la nature peut varier en fonction de la présence de la microflore.

Enfin *Lactobacillus leichmannii* permet le dosage de la vitamine B₁₂ c'est-à-dire de la cyanocobalamine, mais il est aussi sensible aux analogues de cette vitamine. Il est d'ailleurs peu probable que les plantules de colza éliminent la cyanocobalamine elle-même car on ne connaît pratiquement pas de telle synthèse dans le règne végétal.

FRIES pourtant en a trouvé dans des graines de pois germant dans de l'eau stérile et considère qu'elle est synthétisée par les cellules végétales. BABOTH (1), reprenant la même expérience et en incorporant du ¹⁴C aux plantules, infirme cependant cette possibilité de synthèse. VALENCIA (10) a pu aussi déceler des cobalamines dans les feuilles vertes de blé ou de trèfle rouge, ainsi que GRAY et DANIEL (7) qui isolent de la cyanocobalamine des feuilles du navet.

En ce qui concerne les graines de colza, ce facteur de croissance pourrait bien sûr avoir une origine exogène, c'est-à-dire indépendante des synthèses végétales, et être éliminé au cours de la germination. L'augmentation de sa concentration, en fonction du temps de germination du colza, que nous avons pu vérifier dans des semis stériles, nous incite cependant à rejeter cette hypothèse.

Pour élucider l'ensemble de ces problèmes, il sera donc nécessaire d'envisager la séparation chromatographique de ces trois facteurs de croissance de façon à préciser leur nature exacte et leur biosynthèse propre.

RÉSUMÉ

En présence de plantules de colza (variété Crésus), le substrat de germination contenant une microflore tellurique s'enrichit en certains facteurs vitaminiques : acide folique, en tant que facteur de croissance pour *Streptococcus faecalis*, vitamine B₆ « totale » et vitamine B₁₂ ou ses analogues. La nature de ces facteurs vitaminiques est indépendante de la composition initiale de la microflore tellurique ensemencée. La microflore rhizosphérique serait donc responsable de cette spécificité.

SUMMARY

In presence of colza plantules (Cresus variety) the germination substratum with a telluric microflora makes itself rich with some vitaminic substances : folic acid, as a growth factor for *Streptococcus faecalis*, "whole" B₆ vitamin and B₁₂ or its analogues. The kind of these vitaminic substances does not depend on the initial composition of the telluric microflora sowed. The rhizospheric microflora would be on account with this specificity.

BIBLIOGRAPHIE

1. — BABOTH E. The incorporation of ⁶⁰Co into vitamin B₁₂ in pea seedling. *Bot. Közl.*, 1965, **52**, 71-78.
2. — BLONDEAU R. Cinétique de l'évolution des acides aminés et des vitamines hydrosolubles dans la rhizosphère des plantules de colza (*Brassica Napus Oleifera*). *C.R. Acad. Sci. [D] (Paris)*, 1968, **266**, 2017-2020.
3. — BLONDEAU R. Technique de culture pour l'étude des interactions microbiennes au niveau du système racinaire des plantules. *Bull. Soc. Bot. Nord Fr.*, 1968, **21**, 99-104.
4. — BUNT J.S. and ROVIRA A.D. Microbiological studies of some subantarctic soils. *J. Soil Sci.*, 1955, **6**, 119-128.
5. — CHALVIGNAC A. *Contribution à l'étude de la rhizosphère du lin*. Thèse Sc., Paris, 1965.
6. — FRIES L. Vitamin B₁₂ in *Pisum sativum* (L.). *Phys. Plant.*, 1962, **15**, 566-571.
7. — GRAY L.F. and DANIEL L.D. Studies of vitamin B₁₂ in turnip greens. *J. of nutrition*, 1959, **67**, 623-634.
8. — PICCI G. Dosaggio microbiologico di alcune vitamine e di alcuni aminoacidi ceduti dal seme durante la germinazione. *Ann. Fac. Agrar.*, 1959, **20**, 51-60.
9. — ROVIRA A.D. and HARRIS J.R. Plant root excretions in relation to the rhizospheric effect. *Plant and Soil*, 1961, **14**, 199-214.
10. — VALENCIA R. Quelques aspects de la synthèse microbiologique des cobalamines et de la vitamine B₁₂. *Ann. Nutrit. Aliment. Fr.*, 1965, **19**, 679-687.

C - DISCUSSION GENERALE DES RESULTATS ET CONCLUSION.

Comme pour l'exposé de nos propres expériences, nous analyserons dans cette discussion, d'abord le problème de l'excrétion racinaire en culture stériles, puis l'action des microorganismes rhizosphériques sur les excréta.

1) Les substances organiques dans les excréta provenant de semis stériles :

a - sucres : CARRE (1959), GIRARD (1963) et CHALVIGNAC (1965) ne trouvent aucun sucre exsudé dans le milieu de culture des plantes qu'ils cultivent. Nous pensons que ce résultat est dû au défaut de sensibilité de leur méthode de dosage car de nombreux travaux récents qui, parfois, se rapportent aux mêmes plantes, ne permettent plus de mettre en doute cette élimination par le système racinaire.

Dans les exsudats des plantules de Colza, nous avons constaté que le sucre le plus abondant était le glucose. La présence de celui-ci est d'ailleurs signalée dans les exsudats de presque toutes les plantes étudiées. Seuls BHUVANESWARI et coll. (1957) pour le millet, VANCURA et HOVADIK (1963) pour le chou-rave, ne le caractérisent pas parmi les sucres isolés après chromatographie mono-dimensionnelle sur papier.

Par contre GOATLEY et LEWIS (1966), dans le liquide de guttation de germinations de riz et d'orge, JALALI et SURYANARAYANA (1971) dans les excréta de la plantule de blé, RIVIERE (1960) pour cette même céréale mais au moment du tallage, et VANCURA et GARCIA (1969) pour le faux millet (Panicum miliaceum) trouvent que le glucose est le principal sucre s'accumulant dans l'aire racinaire des plantes.

Le fructose, que nous avons aussi caractérisé dans les exsudats du Colza est parfois cité pour les autres plantes, en particulier chez la moutarde et le millet (BHUVANESWARI et coll., 1957), la tomate et le poivrier (VANCURA et HOVADIK, 1963) qui en éliminent abondamment.

Enfin, des pentoses tels que le ribose, le xylose et l'arabinose, d'autres hexoses tels que le galactose et le rhamnose, des di et tri-saccharides tels que le maltose, le saccharose et le raffinose, que nous n'avons pu

mettre en évidence chez le Colza, ont été signalés par certains auteurs cités ci-dessus, et par VANCURA (1964), ROVIRA et Mc DOUGALL (1967).

Cette teneur en sucres des excrétats obtenus à partir de cultures stériles peut diminuer en fonction de l'âge des plantules, comme l'a remarqué ROVIRA (1956) à partir de cultures de pois et d'avoine âgées de 21 jours. Celui-ci interprète d'ailleurs ce phénomène comme une réabsorption des sucres par les radicelles, ou une synthèse d'oligosaccharides, dans l'aire radriculaire des plantes, à partir des oses initiaux. En ce qui concerne le Colza, dans nos conditions expérimentales, nous avons jamais constaté ce phénomène.

Enfin, signalons aussi qu'à partir d'exsudats stériles de graines, il est possible de révéler la présence de sucres : pour la graine du cotonnier, HAYMAN (1969) en trouve ainsi de 0,20 à 0,40 mg, en équivalent glucose.

b - acides aminés : à partir des excrétats de plantules de Colza l'analyse chromatographique sur colonne a permis d'identifier 24 acides aminés. En plus des 10 principaux que nous avons signalé dans la note publiée aux Comptes rendus, il faut donc ajouter l'isoleucine, l'arginine, l'acide γ amino butyrique, l'asparagine, la lysine, le tryptophane, la tyrosine, l'ornithine, la phenyl alanine, la citrulline, la methionine, la cystine, la β alanine et l'hydroxyproline, ces trois derniers n'étant présents qu'à l'état de traces.

Remarquons que la glutamine ne peut être caractérisée en employant cette méthode de séparation des acides aminés, mais par chromatographie sur papier, nous avons pu vérifier (Bull. Soc. Bot.) que sa teneur était relativement importante dans les excrétats. Contrairement à ce que l'on peut constater pour la plupart des autres acides aminés, la concentration de cette glutamine augmente d'ailleurs très rapidement en fonction de l'âge des plantules. (Le même phénomène se produit pour l'acide aspartique).

Au point de vue quantitatif, l'analyse effectuée après séparation sur colonne nous donne une excrétion de $10,3 \cdot 10^{-3} \mu\text{M}$ d'acides aminés pour une plantule, après 6 jours de germination. Ce résultat est inférieur à celui que l'on peut approximativement déterminer après séparation sur papier, mais plusieurs facteurs peuvent expliquer cette différence : tout d'abord, les résultats obtenus après chromatographie sur papier ne sont que semi quantitatifs comme nous l'avons précisé dans la publication. Ensuite, les graines de Colza employées ne sont pas de la même variété : en 1965, nous avons utilisé la variété Valois ; en 1968, la variété Crésus. Enfin, les modalités expérimentales ne sont pas identiques : les résultats publiés en 1965 proviennent de plantules dont les graines ont été préalablement préincubées pendant 24 heures à 26°C alors que par la suite, cette pré-germination a été supprimée car les plantules issues des graines étaient trop grêles.

Dans le tableau I suivant, nous rapportons les résultats quantitatifs globaux obtenus pour différentes plantules, après séparation chromatographique des acides aminés présents dans les excréments. Pour simplifier la lecture, nous avons exprimé tous les résultats en $10^{-3} \mu\text{M}$ par plantule.

Plantules étudiées	Période de végétation	Acides aminés excrétés (en $10^{-3} \mu\text{M}$ par plantule)	
		pendant la période de végétation	par jour
COLZA (Blondeau 1968)	0 - 6 jours	10,3	1,71
LUZERNE (Richter et coll. 1968)	3 - 10 jours	31,1	4,44
RIZ (Sadhu et Das 1968)	0 - 15 jours	8,2	0,54
PIN (Bowen 1969)	14 - 28 jours	104,5	7,46
POIS (Sherrod et Domsch 1970)	5 - 12 jours	227	32,42

TABLEAU I.

Aspect quantitatif de l'élimination des acides aminés
par des plantules cultivées en conditions stériles.

Nous constatons que nos résultats sont du même ordre de grandeur que ceux de RICHTER et coll., relatifs à la luzerne. SHERROD et DOMSCH obtiennent des concentrations nettement supérieures, mais leur matériel, des graines de pois, n'est pas comparable au nôtre : ces graines volumineuses libèrent au moment de la germination des quantités très importantes d'acides aminés provenant des réserves cotylédonaire.

Si nous considérons maintenant les différents acides aminés éliminés par le Colza, nous remarquons l'importance de l'acide glutamique, l'acide aspartique, la glutamine, la sérine, l'alanine et le glycolle. Ils représentent plus de la moitié de la teneur en acides aminés des excrétats. CARRE (1959), VANCURA et HOVADIK (1963) ont aussi étudié, après séparation chromatographique sur papier, les acides aminés présents dans les excrétats de quelques Crucifères : CARRE, pour le chou, le chou-fleur, le chou de Bruxelles et le chou-navet, caractérise l'acide aspartique et la sérine surtout, puis l'asparagine, l'acide glutamique, la glutamine, l'alanine et la leucine. VANCURA et HOVADIK, pour le chou-rave, notent principalement la présence de l'alanine, l'acide aspartique, la leucine, l'acide glutamique, la glutamine, la phényl alanine et la méthionine. Nous constatons ainsi que pour le Colza, nos résultats sont très voisins de ceux qui se rapportent aux plantes de la même famille.

Par contre, le spectre des acides aminés éliminés par les autres plantes est parfois assez différent. Nous n'insisterons cependant pas sur cet aspect du problème, mais dans le tableau II nous avons rassemblé les résultats obtenus pour 4 plantes, après séparation chromatographique sur colonne des exsudats. De nombreux autres résultats ont été publiés mais ils ne sont souvent que qualitatifs ou semi-quantitatifs. En plus des références signalées dans notre première publication (Bull. Soc. Bot.) notons ainsi les travaux de VANCURA (1964) SINGH (1967) ROVIRA et Mc DOUGALL (1967) AYERS et THORNTON (1968) sur le blé et d'autres céréales ; ceux de MILLER et SCHMIDT (1965) sur le haricot, de VANCURA et GARCIA (1969) sur le millet, et de LEELAVATHY (1970) sur le riz. Les résultats consignés dans le tableau II prouvent, d'une part, que le milieu de culture peut intervenir dans la compo-

PLANTULES	COLZA	POIS		LUZERNE	POIS
	(Blondeau 1968)	(Boulter, Jeremy et Wilding 1966)		(Richter, Wilms et Scheffer 1968)	(Sherrod et Domsch 1970)
période de végétation	0 - 6 jours	0 - 14 jours		3 - 10 jours	5 - 12 jours
type de culture	sable	hydroponique	sable	sable	hydroponique
β alanine	tr.	-	-	-	0,44
α alanine	7,50	3,07	4,16	9,14	10,86
arginine	2,20	4,80	4,79	0,64	3,10
asparagine	1,61	-	-	-	-
ac. aspartique	14	22,01	16,18	6,63	7,98
γ NH ₂ butyrique	2,10	tr.	tr.	-	8,66
citrulline	0,69	-	-	-	-
cystine	tr.	1,10	-	-	-
ac. glutamique	16,70	24,13	14,30	2,83	4,88
glycocolle	8,30	3,22	3,50	10,73	3,10
histidine	6,50	2,75	2,56	-	1,77
homoserine	-	14,94	30,87	-	22,83
isoleucine	2,39	1,02	0,94	1,57	2,66
leucine	3,90	1,65	1,53	2,83	3,77
lysine	1,70	2,28	2,69	8,21	3,10
methionine	0,60	-	-	0,64	0,22
ornithine	0,92	3,54	4,20	11,35	0,22
phényl alanine	0,82	1,34	1,47	4,11	2,22
proline	4,70	tr.	tr.	-	2,22
serine	11,40	5,35	5,07	16,08	12,19
threonine	4,10	5,58	4,85	4,73	4,21
tryptophane	1,19	-	-	-	tr.
tyrosine	1,03	1,49	1,18	2,53	1,11
valine	4,90	1,73	1,71	2,83	4,44
non identifié	2,75	-	-	15,14	-

TABLEAU II.

ASPECT QUANTITATIF DES ACIDES AMINES
PRESENTS DANS LES EXCRETATS DE QUELQUES PLANTULES
(LES RESULTATS SONT EXPRIMES EN %).

sition en acides aminés des exsudats (BOULTER et coll. : élimination importante d'homoserine quand les germinations sont effectuées sur sable), et d'autre part, que certains acides aminés peuvent être dominants dans les excrétions de certaines plantes (homoserine pour le pois) et absents chez d'autres (homoserine pour le Colza et la Luzerne). Pour le pois, si les teneurs en certains acides aminés ne correspondent pas en comparant les résultats de BOULTER et coll., et de SHERROD et coll., il faut peut être faire intervenir les variétés qui ne sont pas identiques : les premiers utilisent la variété "Alaska", les seconds, la variété "Wunder von Kelvedon".

Enfin, soulignons qu'en ce qui concerne la cystine, absente dans les exsudats de Colza, BOULTER et coll. (1966) ont démontré que celle-ci est toujours absente quand les germinations sont effectuées sur sable.

c - acides organiques : nous avons identifié de façon constante un seul acide organique dans le milieu de culture des plantules de Colza : l'acide malique. CARRE (1959), à partir des excrétats des crucifères précédemment citées, n'en caractérise aucun ; VANCURA et HOVADIK (1963) pour une autre crucifère : le chou-rave, tout en notant la présence des acides malique, lactique et glycolique, soulignent en outre l'élimination importante de l'acide oxalique. SLANKIS et coll. (1964), VANCURA (1964), ROVIRA et Mc DOUGALL (1967) ont particulièrement étudié ces acides organiques excrétés par de jeunes plantules, mais ne donnent aucune valeur quantitative. Sur ce plan, nous ne pouvons donc pas comparer nos résultats.

d - vitamines hydrosolubles : pour les 8 vitamines du groupe B recherchées, seule la riboflavine n'a pu être décelée dans les excrétats du Colza. Le fait est assez surprenant car les plantes, et même les graines (BOU et BRAEKKAN, 1967) en contiennent des teneurs assez appréciables. Aussi, nous pensons que cette vitamine particulièrement photosensible se dénature lors de la récupération des éluats radicellaires. Récemment NICHIK (1970) a signalé la présence des acides pantothenique et nicotinique, de biotine et de pyridoxine dans les exsudats du Colza, confirmant ainsi les résultats de nos analyses

Etant donné l'absence presque totale de données quantitatives complètes concernant l'élimination de ces vitamines B par les racines, nous résumerons dans le tableau III les résultats obtenus jusqu'à maintenant dans ce domaine. Ce tableau met en évidence l'importance de certaines vitamines plus souvent citées : les acides pantothénique et nicotinique, la thiamine et la biotine. Pour la biotine et les acides pantothénique et nicotinique, les valeurs que nous avons estimées sont du même ordre de grandeur que celles de ROVIRA et HARRIS (1961), pour des graines et une période de germination similaires.

	Rovira et Harris 1961	Sulochana 1962	Chalvignac 1965	Goatley et coll. 1966	Gvamichava 1966	Nichik 1970
matériel végétal	tomate et légumineuses	cotonnier	lin	riz-blé orge	lin-maïs seigle	pois colza
ac. pantoth.	+	.	+	+	+	+
ac. nicotinique	+	.	+	.	+	+
ac. folique	.	.	+	.	.	.
thiamine	tr.	+	+	+	+	.
biotine	+	+	+	+	+	+
pyridoxine	0	+	0	+	.	+
riboflavine	tr.	.	+	+	.	.

TABLEAU III.

Présence de vitamines hydrosolubles dans les excréments de quelques plantes.

Nous ne reviendrons pas ici sur les problèmes que pose l'identification de l'acide folique et de la vitamine B₁₂, mentionnés dans la précédente note publiée aux Annales de l'Institut Pasteur, les 3e et 4e parties de ce travail étant entièrement consacrées à leur étude.

Origine des substances excrétées :

Nous n'avons pas analysé les composés organiques présents dans les racines de Colza, mais il est probable que toutes les substances identifiables dans les exsudats proviennent des tissus des plantules. C'est d'ailleurs l'avis de RIVIERE (1960) et de CHALVIGNAC (1965). Cette dernière, pour le lin, retrouve ainsi dans un extrait alcoolique de plantules, tous les acides aminés, acides organiques et vitamines hydrosolubles présents dans les exsudats. D'autres chercheurs : TESAR et KUTACEK (1955), BOULTER et coll. (1966), HOFBAUER et MINAR (1968) ont limité leurs analyses en ne considérant que les acides aminés, mais leurs conclusions sont identiques. BOULTER et coll., pour le pois, précisent cependant que sur le plan qualitatif, le taux de certains amino-acides est différent dans les racines ; TESAR et KUTACEK remarquent aussi que l'acide γ amino-butyrique et la proline ne sont pas retrouvés dans les exsudats de blé. En ce qui concerne le Colza, signalons que VAN ETTEN et coll. (1963) notent dans les graines de crucifères une concentration particulièrement élevée d'acide glutamique et aspartique. Or, comme nous l'avons précédemment souligné, ce sont surtout ces acides aminés que l'on retrouve dans les excrétions.

Site d'exsudation des substances organiques :

PEARSON et PARKINSON (1961), SCHROTH et SNYDER (1961) démontrent, après imprégnation sur papier filtre des exsudats de racines et révélation des substances positives à la ninhydrine, que les zones d'excrétion correspondent aux régions jeunes présentant une activité protéolytique élevée. De même SLANKIS et coll. (1964), par autoradiographie des sécrétions racinaires de plantules de pin après exposition de la partie foliaire en présence de $^{14}\text{C O}_2$, constatent que la distribution de la radioactivité se manifeste surtout au niveau des jeunes racines et à l'apex des racines plus âgées.

Cependant Mc DOUGALL (1968), en utilisant une technique basée aussi sur l'utilisation du $^{14}\text{C O}_2$, observe une exsudation des composés marqués au ^{14}C , non pas aux extrémités, mais d'une façon uniforme autour des racines de blé.

Récemment, cette contradiction apparente dans les résultats vient de trouver une explication pour le blé (Mc DOUGALL et ROVIRA 1970) : deux types de composés marqués au ^{14}C interviendraient : les uns, non diffusibles, étant exsudés par les apex, alors que les autres, diffusibles, s'élimineraient sur toute la longueur des racines.

2 - Evolution de la teneur en acides aminés et vitamines des excréats en présence d'une microflore :

Dans la rhizosphère du Colza, nous avons trouvé une diminution très rapide de la teneur en acides aminés des excréats quand les cultures sont effectuées en présence d'une microflore apportée par incorporation au milieu de culture d'une suspension-dilution de terre. Pour certains acides aminés en particulier : l'acide glutamique, l'acide aspartique, la leucine, la proline et la valine, nous avons d'ailleurs souligné l'importance de ce phénomène.

Cependant la bibliographie nous donne très peu de renseignements dans ce domaine. Certains auteurs ont abordé ce problème, mais dans un contexte tout à fait différent du nôtre : c'est le cas de KUNC et MACURA, (1965) qui étudient la minéralisation d'une mixture d'acides aminés introduite dans une terre, afin de permettre l'établissement d'une rhizosphère artificielle, et de GUIRGUIS et coll. (1969) qui, par une méthode manométrique, comparent la vitesse d'oxydation de quelques acides aminés incorporés dans une terre rhizosphérique ou non rhizosphérique.

D'autres auteurs : PAUL et SCHMIDT (1961), VAGNEROVA et VANCURA (1962) démontrent un phénomène inverse : les premiers trouvent en effet que la concentration en acides aminés libres d'un sol rhizosphérique est plus élevée que dans un sol témoin ; les seconds prouvent que des souches bactériennes d'origine rhizosphérique produisent des acides aminés dans un milieu de culture de base synthétique. Leurs conditions expérimentales étant très différentes des nôtres, en particulier pour VAGNEROVA et VANCURA, il est très difficile d'interpréter ces données.

Nos résultats confirment néanmoins ceux de ROVIRA (1959). Celui-ci, en comparant par chromatographie sur papier les acides aminés excrétés par le système racinaire de la tomate en conditions stériles et en présence d'une microflore, note que le taux de ceux-ci diminue lorsque les conditions de culture ne sont pas stériles. Ce phénomène est particulièrement net pour l'acide glutamique, l'alanine et la leucine, alors que pour la glutamine, il n'existe pratiquement aucune variation.

Dans la seconde partie de ce mémoire, lorsque nous considérerons l'activité microbienne dans la rhizosphère du Colza, nous reviendrons sur cette utilisation des acides aminés pour les bactéries rhizosphériques.

"In situ", contrairement aux acides aminés, les analyses vitaminiques montrent que les vitamines hydrosolubles sont rarement utilisées par la microflore rhizosphérique du Colza. Au contraire, on peut mettre en évidence leur synthèse par voie microbienne dans le substrat de culture des plantules.

A l'appui de ces résultats, signalons que plusieurs chercheurs russes ont mis en évidence la synthèse de vitamines du groupe B par différentes bactéries d'origine rhizosphérique. C'est le cas de SMALIJ (1963 et 1964), KISELEVA (1967), PETRENKO (1968). KISELEVA précise l'importance de la synthèse d'acide nicotinique et de thiamine par des bactéries rhizosphériques du cotonnier, PETRENKO, celle de la thiamine, l'acide pantothénique, la pyridoxine, et la biotine par des bactéries rhizosphériques du maïs.

BALICKA et coll. (1965) notent aussi la synthèse de certaines vitamines dans le milieu de culture de bactéries considérées comme rhizosphériques : Bacillus oligonitrophilus, B. mesentericus, B. subtilis, mais comme nous le verrons dans le chapitre suivant, nous ne pensons pas que ces bactéries du genre Bacillus puissent être considérées comme des germes typiquement rhizosphériques. Par contre, les résultats de HUSSAIN et VANCURA (1970) concernant la production, dans le milieu de culture, de biotine, d'acide nicotinique et pantothénique par des Pseudomonas et en particulier Ps. fluorescens isolés de la rhizosphère du maïs présentent un certain intérêt.

Les teneurs en thiamine et en biotine de terres rhizosphériques ou non, analysées par ROULET et SCHOPFER (1950) prouvent de même qu'une synthèse de ces vitamines est imputable aux germes rhizosphériques.

Enfin, les recherches de LOCHHEAD (1957) relatives à la synthèse de vitamines B par des bactéries isolées d'une terre témoin et d'une terre rhizosphérique (culture d'avoine) conduisent, par un moyen différent, aux mêmes résultats que les nôtres puisque 81,7 % des souches rhizosphériques sont capables de synthétiser une ou plusieurs vitamines, alors qu'à partir de la terre témoin, il n'en compte que 50,5 % seulement.

Conclusion :

Autour des graines de Colza en germination et pendant le développement du système racinaire, les germes telluriques sont donc en présence d'un apport appréciable de sucres simples, d'acides aminés et de vitamines hydrosolubles. Certaines bactéries, stimulées par ces facteurs de croissance, donnent ainsi naissance à la microflore rhizosphérique. Cette flore utilise les acides aminés exsudés par les racines, mais reste plutôt indifférente vis-à-vis des vitamines. Nous pouvons ainsi supposer que la microflore rhizosphérique du Colza, dans nos conditions expérimentales, sera caractérisée par la présence de germes à pouvoir de synthèse assez élevé.

2^e PARTIE

LA MICROFLORE RHIZOSPHERIQUE

DES PLANTULES DE COLZA

ACTIVITE BIOLOGIQUE ET SPECTRE BACTERIEN

Dans ce chapitre, complémentaire du précédent, nous allons étudier l'aspect purement microbiologique de la rhizosphère des plantules de Colza. Il est probable en effet que toutes les substances organiques libérées par le système racinaire du Colza, vont affecter plus ou moins sélectivement le développement de certains groupements bactériens de la microflore tellurique environnante. Deux points peuvent être envisagés dans ce phénomène : d'une part l'activité biologique et physiologique de la microflore rhizosphérique, activité qui sera fonction des potentialités enzymatiques de ces bactéries et du type de métabolites mis à la disposition de la flore microbienne par les plantes ; d'autre part le spectre bactérien proprement dit de la flore rhizosphérique, c'est à dire les différents germes, taxonomiquement définis, qui seront stimulés. Nous allons successivement étudier, pour le Colza, les deux aspects de ce problème.

A - L'ACTIVITE BIOLOGIQUE DE LA MICROFLORE RHIZOSPHERIQUE DU COLZA

Les premières recherches effectuées dans ce domaine étaient basées sur l'emploi du bleu de méthylène, dont la vitesse de réduction permettait de traduire l'activité métabolique de la microflore rhizosphérique. Depuis, des techniques plus précises, mises au point par l'école de POCHON et relatives aux analyses des "groupements fonctionnels", ou par celle de LOCHHEAD orientées plutôt vers l'étude des groupements nutritionnels, ont permis d'approfondir la connaissance de cette activité microbienne et d'en déduire son rôle. Pour le Colza, nous avons surtout employé ces techniques.

Par les termes "groupements fonctionnels" ou "groupements physiologiques" on sous-entend les ensembles de germes doués d'une fonction physiologique bien définie, constituant un chaînon du cycle de l'azote ou du carbone. Leur différenciation est basée sur le choix de certains milieux de culture sélectifs, la caractérisation finale étant obtenue par l'analyse chimique des résultats.

Les groupements nutritionnels sont définis uniquement par le pouvoir de synthèse des bactéries. Celui-ci est très variable puisque certains germes peuvent être cultivés sur des milieux strictement minéraux alors que d'autres exigent en plus de nombreux facteurs de croissance, des substances dont la structure n'est pas encore connue, qui sont présentes dans l'extrait de terre. Entre ces deux extrêmes existe bien sûr toute une gamme que nous avons arbitrairement divisée en 4 groupes en fonction des données déjà acquises dans ce domaine par d'autres chercheurs.

Les résultats de nos recherches relatives aux caractéristiques physiologiques et nutritionnelles de la microflore rhizosphérique du Colza ont été publiés (Bull. Soc. Bot. Nord Fr., 1966, 19).

ACTIVITE BIOLOGIQUE DE LA MICROFLORE AUTOUR DU SYSTEME RADICULAIRE DU COLZA (BRASSICA NAPUS) PENDANT LES PREMIERS STADES DE SA CROISSANCE

Par R. BLONDEAU (*)

Nous avons déjà montré que des substances organiques, notamment sucres et acides aminés, étaient éliminés par le colza pendant sa germination et ses premiers stades de croissance (BLONDEAU 1965). Dans cette seconde étape, nous nous sommes proposés d'étudier les répercussions de cette accumulation d'éléments énergétiques sur l'équilibre de la microflore tellurique. Pour cela, nous avons encore utilisé la culture en tube avec substrat artificiel, procédé commode et plus rigoureux que la culture en pots. Les résultats obtenus dans ces conditions portent sur l'activité biologique globale (numération de la microflore totale) et sur les groupements bactériens physiologiques, morphologiques et nutritionnels.

Les travaux relatifs à ces modifications intervenant dans la microflore présente autour des graines au moment de leur germination sont assez récents. Notons les recherches de TIMONIN (1940), WALLACE et KING (1954), LOCHHEAD et ROUATT (1955), KING et WALLACE (1956), ROVIRA (1956), KATZNELSON et ROUATT (1957), MACURA (1958), ROUATT (1959) et WAGNEROVA, CATSKA et MACURA (1960), qui ont utilisé des caryopses de blé, d'avoine ou d'orge. Soulignons aussi les travaux de POCHON et ses collaborateurs (1960), sur le maïs ; de WOLDENDORP (1962) sur le ray-grass et le pois ; enfin ceux de CHALVIGNAC (1965) sur le lin.

TECHNIQUE DE CULTURE

Les tubes de culture utilisés (4 × 15 cm) contiennent de la laine de verre, supportant 20 g de sable de Fontainebleau lavé aux acides. Après bouchage au coton et stérilisation, ces tubes reçoivent 9 ml de solution nutritive stérile de KNOP diluée de moitié, ainsi qu'une microflore totale, représentée par 1 ml d'une suspension de terre à 1 %.

(*) Séance du 12 janvier 1966.

Les graines de colza (variété Valois) sont stérilisées par passage dans un bain d'hypochlorite de calcium pendant 20 minutes, suivi de 5 lavages successifs dans de l'eau distillée stérile.

Ces graines sontensemencées à raison de 50 ou 100 par tube, selon l'étude envisagée.

Après l'ensemencement, 3 g de sable, préalablement stérilisé dans de petits tubes, sont versés sur chaque semis, de façon à favoriser la colonisation ultérieure de la surface des graines par la microflore.

Enfin, les tubes sont recouverts d'un papier d'étain et placés à l'obscurité pendant 24 heures dans une étuve à 26° C. Ils sont ensuite soumis à une température variant de 20 à 22° C, et reçoivent alors 12 heures de lumière et 12 heures d'obscurité par jour.

TECHNIQUES D'ANALYSE

I. — Numération de la microflore totale.

Elle est effectuée suivant la technique classique d'ensemencement de suspensions-dilutions sur gélose-extrait de terre (POCHON 1954). Ces suspensions-dilutions sont réalisées à partir de tubes contenant les semis ainsi qu'à partir de tubes témoins. Une quantité connue de chacune d'entre elles est étalée sur des plaques gélosées à l'extrait de terre. Après incubation, à l'étuve à 28° C, on procède au comptage des colonies et à l'interprétation des résultats.

Cette appréciation de la microflore totale, témoin de l'activité biologique globale présente dans les tubes de culture, est effectuée après 0, 1, 2, 3, 4, 5, 7 et 9 jours de germination.

Chaque tube de cultureensemencé contient 50 graines de colza.

II. — Étude des groupements bactériens physiologiques.

Ici encore, on effectue des séries de dilutions de 10^{-1} à 10^{-9} , et chacune d'entre elles sert àensemencer les milieux sélectifs pour l'étude de l'ammonification, la protéolyse, la dénitrification (cycle de l'azote), et l'amylolyse (cycle du carbone).

a) Groupe des ammonifiants.

La technique utilisée est celle de BARIAC et POUCHON (1953) modifiée par CHALVIGNAC (1962). L'asparagine introduite dans le milieu de culture caractérise la fonction ammonifiante.

b) Groupe des protéolytiques.

Le milieu salin utilisé est additionné de gélatine, suivant LAJUDIE et CHALVIGNAC (1956).

c) Groupe des dénitrificateurs.

Il a été étudié suivant la méthode de BARIAC (1952) qui préconise un milieu de culture simple à base de nitrate de potassium.

d) Groupe des amylolytiques.

La technique a été mise au point par AUGIER et MOREAU (1960). Le milieu électif pour ces germes contient, en particulier, du nitrate de potassium et de l'amidon soluble.

Pour chaque groupement bactérien, l'analyse a lieu après 3, 5 et 9 jours de germination.

Les tubes de culture ensemencés contiennent toujours 50 graines de colza.

III. — Etude des groupements morphologiques et nutritionnels.

1°) *Isolement des bactéries.*

Les isollements bactériens sont effectués à partir de dilutions adéquates étalées sur plaques gélosées à l'extrait de terre. Après incubation, seules les plaques présentant 20 à 30 colonies sont utilisées. Les souches ainsi obtenues (50 ou 100) sont repiquées sur le milieu de conservation semi-solide de LOCHHEAD (1952).

Ces isollements sont établis après 5 jours de germination, à partir de tubes contenant 100 graines de colza.

2°) *Etude des groupements morphologiques.*

Seules, la morphologie et la coloration de Gram ont été retenues. Cette coloration de Gram a été effectuée suivant la technique de LASSEUR, DUPAIX et MAGUITOT (1931), préconisée par BUTIAUX, BEERENS et TACQUET (1963).

3°) *Etude des groupements nutritionnels.*

Le pouvoir de synthèse des souches bactériennes isolées est testé par ensemencement de celles-ci sur quatre milieux nutritionnels différents, choisis parmi les sept de LOCHHEAD et CHASE (1943).

- Milieu B : Milieu de base strictement minéral et glucosé (K_2HPO_4 , KNO_3 , $MgSO_4$, $CaCl_2$, $NaCl$, Cl_2Fe , glucose).
- Milieu A : Il est identique au milieu B, mais contient en plus des acides aminés (casamino-acid vitamine free Difco).
- Milieu AG : Il est identique au milieu A, mais contient en plus des facteurs de croissance (thiamine, biotine, pantothénate de calcium, acide folique, acide nicotinique, riboflavine, pyridoxine, acide p. aminobenzoïque, choline, inositol).
- Milieu YS : Il est à base d'extrait de levure (yeast extract Difco) et d'extrait de terre.

Pour chacune des souches isolées, deux ensemencements successifs sont effectués pour le même milieu, afin d'éliminer les auto-apports de facteurs de croissance présents dans l'inoculum.

D'après la prolifération obtenue sur cette gamme de milieux, les souches sont classées dans l'un des quatre groupements proposés.

RESULTATS

I. — Microflore totale.

La terre utilisée pour l'ensemencement de la microflore a été prélevée dans un champ de grande culture (après récolte de pomme de terre). 1 ml d'une suspension au 1 % de cette terre contient 26.000 germes, qui sont ainsi introduits dans chaque tube de culture.

Les résultats obtenus sont rassemblés dans le tableau I. Dans les tubes ensemencés de colza, la stimulation de la flore bactérienne est déjà très nette 2 jours après le semis, où l'on trouve près de 800 fois plus de germes que dans les tubes témoins.

Remarquons toutefois que dans ces tubes témoins, une multiplication bactérienne est aussi décelable vers le cinquième jour de culture. Elle est due à la présence inévitable de substances organiques dans la suspension de terre ensemencée. Les résultats les plus significatifs, tout au moins dans l'optique de ce travail, sont donc obtenus durant les quatre premiers jours de germination.

Jours après le semis	Stade de croissance (longueur moyenne des racines)	Nombre de germes présents (en millions /ml de milieu nutritif)	
		Tube témoin	Tube ensemencé
0	—	0,0026	0,0026
1	sortie de la radicule	0,0025	0,0066
2	10 mm	0,046	36,5
3	18 mm	0,059	82
4	27 mm	0,092	86
5	35 mm	11,4	127,5
7	41 mm	48,5	205
9	46 mm	73	685

TABLEAU I

Numération de la microflore totale

II. — Groupements bactériens physiologiques.

Les résultats sont résumés dans le tableau II. Le premier chiffre indiqué dans chacun des groupements considérés correspond au nombre de germes ensemencés par ml de milieu de culture.

Il ressort de ces résultats une très forte stimulation de la microflore ammonifiante ; de la microflore protéolytique, qui par ailleurs est en connexion très étroite avec la précédente ; ainsi que de la microflore dénitrifiante. L'effet maximum, obtenu par comparaison aux tubes témoins,

se situe après 2 jours de germination pour l'ammonification et la protéolyse, et après 5 jours pour la dénitrification. En ce qui concerne la microflore amylolytique, une stimulation n'est décelable qu'au deuxième jour de germination.

Jours après le semis		Ammonificat.	Protéolyse	Dénitrification	Amylolyse
0 jour		2500	1900	700	800
2 jours	T	0,045 .10 ⁶	0,030 .10 ⁶	0,01 .10 ⁶	0,05 .10 ⁶
	E	9,5 .10 ⁶	0,5 .10 ⁶	0,26 .10 ⁶	2,5 .10 ⁶
5 jours	T	2,5 .10 ⁶	0,9 .10 ⁶	0,05 .10 ⁶	13 .10 ⁶
	E	25 .10 ⁶	50 .10 ⁶	16 .10 ⁶	25 .10 ⁶
9 jours	T	25 .10 ⁶	18 .10 ⁶	26 .10 ⁶	130 .10 ⁶
	E	950 .10 ⁶	500 .10 ⁶	500 .10 ⁶	350 .10 ⁶

T = tube témoin ; E = tube ensemencé.

TABLEAU II

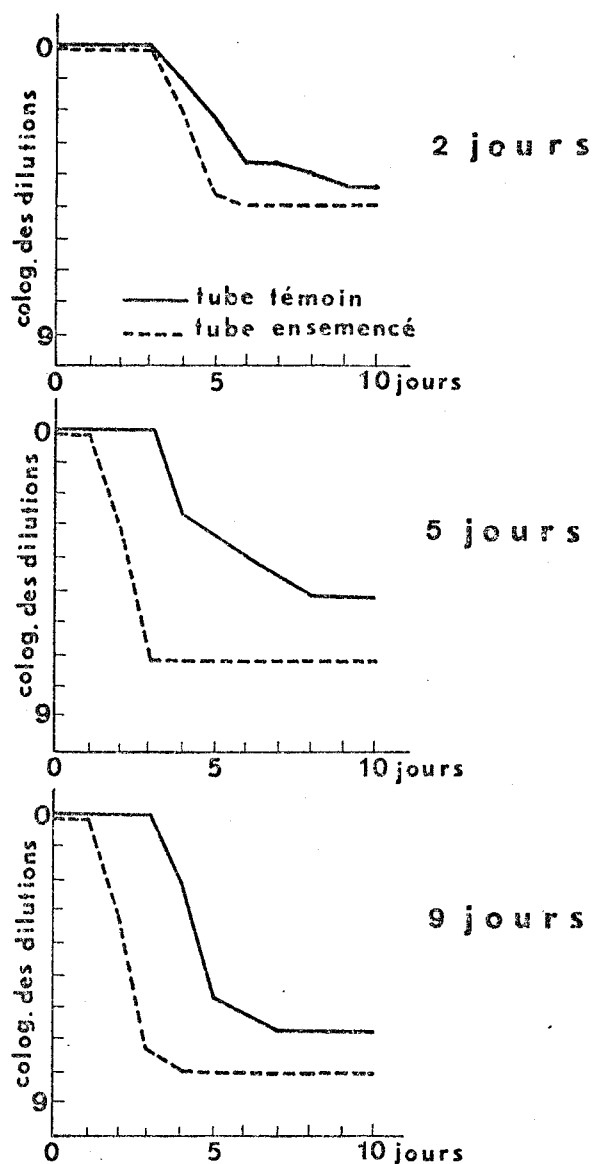
*Influence du stade de croissance du colza
sur certains groupements bactériens physiologiques
(Nombre de germes par ml de milieu de culture)*

Remarquons aussi que souvent, les résultats de ces numérations de microflores fonctionnelles semblent très élevés par rapport au dénombrement de la microflore totale (Tableau I). Cette correspondance imparfaite des chiffres est cependant explicable par les techniques de numérations utilisées, qui sont différentes.

Notons enfin que des essais de numération de germes fixateurs d'azote atmosphérique en aérobiose, de germes nitreux et de germes nitriques n'ont donné aucun résultat, tout au moins à partir de la dilution de terre ensemencée. (1 ‰).

Les résultats enserés dans le tableau II témoignent donc d'une augmentation du nombre de bactéries présentes. Par contre, il faut aussi souligner que leur activité est fortement stimulée. Pour illustrer ce phénomène, nous avons choisi les courbes relatives au dosage de l'activité protéolytique, qui sont particulièrement éloquentes à 5 et 9 jours de germination (graphique I).

— 32 —



GRAPHIQUE I : Activité protéolytique après 2, 5 et 9 jours de germination.

III. — Groupements bactériens morphologiques.

Les résultats obtenus (Tableau III) portent sur des séries de 100 isollements effectués à partir :

— de la microflore totale introduite dans les tubes au temps 0

- de la microflore présente dans les tubes témoins après 5 jours de culture. Le développement de cette flore a été fonction de la composition du milieu de KNOP, des substances contenues dans la suspension de terre, et des conditions physiques de culture (température en particulier).
- de la microflore présente dans les tubesensemencés de colza après 5 jours de germination. Les paramètres du développement de cette flore sont les mêmes que dans les tubes témoins, avec en plus la présence des excréta radicaux.

	Morphologie		Réaction de Gram	
	Coccis et cellules coccoïdes (%)	Bâtonnets (%)	Positive (%)	Négative (%)
t	8	91	86	14
T	49	51	98	2
E	2	98	57	43

t = microflore introduite.

T = microflore des tubes témoins.

E = microflore des tubesensemencés.

TABLEAU III

Incidence de la germination de la graine du colza sur la morphologie et la réaction de Gram de la microflore tellurique

Ces résultats indiquent une très nette stimulation des bâtonnets gram négatif.

IV. — Groupements bactériens nutritionnels.

Pour essayer de préciser le plus possible le type nutritionnel stimulé, nous avons utilisé 2 microflores d'origine différente. La microflore *a* provient d'une terre fertile de grande culture (c'est elle qui a donné les résultats précédents). La microflore *b* provient d'une terre de prairie.

Dans chacun des cas, 3 séries d'isolements de souches bactériennes sont encore considérées. Cependant les séries se rapportant à la microflore *b* ne portent que sur 50 isolements.

Microflore introduites	Groupements nutritionnels				
	B (%)	A (%)	AG (%)	YS (%)	
microflore a	t	74	9	12	5
	T	59	40	1	0
	E	23	68	9	0
microflore b	t	48	8	26	18
	T	86	14	0	0
	E	58	40	2	0

TABLEAU IV

*Incidence de la germination de la graine du colza
sur les types nutritionnels de la microflore tellurique*

Les résultats (Tableau IV) prouvent une stimulation très nette des bactéries cultivant sur azote aminé (groupe A) en absence de facteurs de croissance et d'extrait de terre.

DISCUSSION ET CONCLUSION

Les sécrétions radicellaires du colza provoquent donc de profondes modifications dans l'équilibre biologique de la microflore tellurique.

L'activité globale de cette microflore, déjà très apparente après seulement 2 jours de germination, se trouve caractérisée par une prolifération des bâtonnets à gram négatif. Cette particularité, signalée par de nombreux expérimentateurs, se retrouve d'ailleurs dans la rhizosphère des plantes adultes.

A propos des groupements bactériens envisagés en fonction de leur activité physiologique, ammonification, protéolyse et dénitrification sont stimulées. L'augmentation du nombre des ammonifiants et protéolytiques a déjà été signalée par ROUAT, dès les premiers jours de germination du blé. Par contre, POCHON et coll., étudiant le maïs, note un comportement différent de ces groupements suivant que les caryopses sont désinfectés ou pas. KING et WALLACE, à propos de l'avoine, trouvent même une inhibition assez forte des protéolytiques. En ce qui concerne la dénitrification, de nombreux auteurs (ROUAT, POCHON et coll., WOLBENDORP, CHALVIGNAC) sont cependant d'accord pour admettre une stimulation importante dès les premiers stades de croissance de la plantule.

Enfin, les écarts obtenus dans les résultats concernant les amylo-lytiques ne sont pas suffisamment significatifs pour en conclure une activité liée à la germination.

De l'étude nutritionnelle de la microflore, il résulte une dominance indiscutable des germes exigeant de l'azote aminé. La prolifération de ces germes est à mettre en parallèle avec l'élimination d'acides aminés par le colza, notamment acide glutamique, alanine, arginine, glutamine et proline, présents aux tous premiers stades de germination.

Les mêmes conclusions sont émises par LOCHHEAD et ROUATT, ROUATT, et TARDIEUX et coll. MACUPA. quant à lui, ne trouve cette stimulation des bactéries de type nutritionnel A que lorsque la graine, non stérilisée, est la seule source de micro organismes.

En ce qui concerne le colza, notre but sera donc maintenant d'étudier le métabolisme de cette microflore préférentiellement stimulée, de façon à rechercher les éventuelles sécrétions bénéfiques pour la plante.

BIBLIOGRAPHIE

- AUGIER J. et MOREAU R. (1960). — L'activité amylolytique des sols. Méthode d'étude et interprétation.
Ann. Inst. Pasteur, 99, 131-141.
- BARJAC H. de (1952). — La puissance dénitrifiante du sol. Mise au point d'une technique d'évaluation.
Ann. Inst. Pasteur, 83, 207-212.
- BARJAC H. de et POCHON J. (1953). — Titrage du pouvoir ammonifiant de la microflore des sols.
Ann. Inst. Pasteur, 85, 82-89.
- BLONDEAU R. (1965). — Elimination de substances organiques au cours de la germination du colza (*Brassica Napus oleifera*) I. Oses, acides aminés, acides organiques.
Bull. Soc. Bot. Nord France, 18, 97-105.
- BUTTIAUX R., BEERENS H et TACQUET A. (1963). — Manuel de techniques bactériologiques.
Ed. Médicales Flammarion.
- CHALVIGNAC M.A. (1962). — Modifications apportées à la technique d'appréciation de la microflore ammonifiante.
Informations techniques de microbiologie du sol, 1, 25-27.
- CHALVIGNAC M.A. (1965). — Contribution à l'étude de la rhizosphère du lin.
Thèse, Paris.
- KATZNELSON H. and ROUATT J.W. (1957). — Studies on the incidence of certain physiological groups of bacteria in the rhizosphere.
Can. J. Microbiol., 3, 265-269.
- KING H. de L. and WALLACE R.H. (1956). — Morphological and physiological groups of soil bacteria from the roots of barley and oats.
Can. J. Microbiol., 2, 473-481.
- LAJUDIE J. et CHALVIGNAC M.A. (1956). — Appréciation de l'activité protéolytique de la microflore du sol.
Ann. Inst. Pasteur, 90, 359-361.
- 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, 4, 121-132.
- LOCHHEAD A.G. (1952) — Soil microbiology.
Ann. Rev. Microbiol. 6, 185.
- LOCHHEAD A.G. and CHASE F.E. (1943). — Qualitative studies of soil micro-organisms. V. Nutritional requirements of the predominant bacterial flora.
Soil. Sci., 55, 185-195.

- LOCHHEAD A.G. and ROUATT J.W. (1955). — The « rhizosphere effect » on the nutritional groups of soil bacteria.
Proc. Soil. Soc. Ann., 19, 48-49.
- MACURA J. (1958). — Seed and soil bacteria in relation to the rhizosphere effect.
Fol. Biol., 4, 274-280.
- POCHON J. (1954). — Manuel technique d'analyse microbiologique du sol.
Masson Edit., Paris.
- POCHON J., ROCHE A., CHARPENTIER M., TARDIEUX P. (1960). — Effet rhizosphérique du maïs (*Zea Mays* L.) en culture hydroponique aux premiers stades de croissance. I/ Groupements bactériens physiologiques.
Trans. 7th. intern. congr. Soil Sci., 3, 558-561.
- ROUATT J.W. (1959). — Initiation of the rhizosphere effect.
Canad. J. Rees., 18, 307-317.
- ROVIRA A.D. (1956). — A study of the development of the root surface microflora during the initial stages of plant growth.
J. appl. Bact., 19, 72-79.
- TARDIEUX P., LAJUDIE J. et CHALVIGNAC M.A. (1960). — Effet rhizosphérique du maïs (*Zea Mays* L.) en culture hydroponique aux premiers stades de croissance. II/ Morphologie des bactéries et types nutritionnels.
Trans. 7th. intern. congr. Soil Sci., 3, 562-567.
- TIMONIN M.I. (1940). — The interaction of higher plants and soil micro-organisms. I/ Microbial population of rhizosphere of seedlings of certain cultivated plants.
Canad. J. Res., 18, 307-317.
- VAGNEROVA K., CATSKA V. and MACURA J. (1960). — Composition and properties of bacterial and fungal flora of wheat rhizosphere.
Trans. 7th. intern. congr. Soil Sci., 3, 568-574.
- WALLACE R.H. and KING H. de L. (1954). — Nutritional groups of soil bacteria on the roots of barley and oats.
Soil Sci. Soc. Amer. Proc., 18, 282-285.
- WOLDENDORP J.W. (1962). — The quantitative influence of the rhizosphere on denitrification.
Plant and soil, 17, 267-270.

COMPARAISON AVEC LA RHIZOSPHERE DES AUTRES PLANTES.

Nous limiterons cette discussion au problème des groupements physiologiques et nutritionnels. En effet, les groupements morphologiques, tels que nous les avons étudiés, ne sont pas significatifs et pourtant, cette technique employée est très classique pour ce genre de travail. Cette anomalie est due à la morphologie très particulière de la flore dominante des terres du Nord de la France que nous avons toujours utilisées comme inoculum. Lorsque nous avons effectué ces expériences, nous n'avions aucune référence sur la taxonomie des germes colonisant ces terres et ce n'est qu'au moment d'aborder cet aspect, dont les résultats constituent le chapitre suivant, que nous nous sommes rendus compte de la difficulté que présentaient les examens morphologiques et les colorations de Gram. Comme nous le verrons plus loin, le groupement bactérien le plus abondant dans nos microflores totales se rapporte au genre Arthrobacter, c'est à dire à des germes dont la morphologie varie en fonction de l'âge, du milieu de culture, et ceci d'une façon plus ou moins rapide suivant les souches. Leur Gram aussi est inconstant : le 1er jour d'incubation, il est souvent négatif puis, progressivement, il devient positif. Ici encore, suivant les souches, la positivité peut apparaître dès le 1er jour, mais parfois, elle n'est effective que vers le 5ème ou 6ème jour. En présence de tels germes, nous ne pouvons donc tirer aucune conclusion des examens microscopiques, effectués souvent entre 24 et 36 heures d'incubation.

Groupements physiologiques :

En ce qui concerne ces groupements, nous avons constaté, pour la rhizosphère du Colza, une stimulation de l'activité ammonifiante, protéolytique et dénitrifiante, et aussi, mais à un moindre degré, celle de l'amylolyse. Dans la bibliographie, aucune recherche de ce genre relative au Colza ne permet de comparer ces résultats, mais un travail de STRZELCZYK (1961) portant sur l'ammonification et la dénitrification dans la rhizosphère d'une crucifère : le radis, et de deux autres plantes : le blé et l'oignon, confirme l'activité intense de ces groupements physiologiques. Celle-ci, après 21 et 70 jours de culture du radis, est toujours très supérieure à celle de la terre témoin, et souvent même à celle des rhizosphères du blé et de l'oignon.

Il est aussi intéressant de comparer ces résultats obtenus à partir du Colza, avec ceux qui nous ont été donnés par l'endive (BLONDEAU 1965) car les microflores telluriques employées au départ sont de même nature. Or, pour l'endive, nous avons une intense activité amylolytique, une ammonification assez importante, mais une protéolyse identique à celle des témoins. Quoique les techniques de culture soient différentes, l'endive étant cultivée en milieu hydroponique, nous sommes quand même tentés d'admettre, dans une certaine mesure, qu'une spécificité vis à vis de la plante peut intervenir.

Dans la publication précédente, nous avons déjà noté que ROUATT (1959) et CHALVIGNAC (1965) avaient remarqué une forte activité ammonifiante et dénitrifiante dans la rhizosphère. Les travaux de ROUATT portaient sur le blé, ceux de CHALVIGNAC, sur le lin. D'autres, dont KATZNELSON et Coll. (1956 et 1957) étudiant la rhizosphère du blé, de l'avoine, de l'orge et du riz, et BALIKA (1958) étudiant le seigle et la vesce, aboutissent aux mêmes résultats. Il semble donc que l'ammonification et la dénitrification constituent des groupements prépondérants, et que ce phénomène soit général pour les rhizosphères. L'intense activité dénitrificatrice peut s'expliquer par la consommation élevée d'oxygène par les racines et la microflore, créant des conditions d'anacrobiose, et par la présence, à proximité des racines, des donneurs d'hydrogène. Cette activité est probablement responsable de certaines pertes d'azote.

L'activité amylolytique ne semble pas, quant à elle, caractéristique des rhizosphères. Nous avons déjà signalé que pour l'endive, la stimulation était très supérieure à celle que présentait le Colza. Si ROUATT (1959) pour le blé, trouva de nombreux germes amylolytiques, POCHON et Coll. (1960) pour le maïs, CHALVIGNAC (1965) pour le lin, démontrent soit un effet nul, soit une inhibition de ces germes. Ces résultats confirment donc notre opinion.

Nous avons aussi, pour le Colza, noté l'absence de germes nitrifiants. Ce phénomène semble général puisque parmi tous les auteurs cités ci-dessus qui ont testé cette activité, aucun ne souligne une stimulation quelconque. Si, dans certains cas, on a pu attribuer cette absence d'activité à une inhibition provoquée par des substances toxiques émises par les racines (THERON 1951)

ou présentes dans le sol (SOULIDES et CLARK 1958), dans la majorité des cas il faut plutôt trouver l'explication dans la faible teneur de la rhizosphère en ion NH_4^+ (MACURA 1966). En effet, la nitrification dépend de la libération de l'ion NH_4^+ , mais si la vitesse de minéralisation ne dépasse pas l'emploi hétérotrophe de l'azote par la plante, ou si elle ne dépasse pas la vitesse de l'immobilisation microbienne, cette nitrification se trouve ainsi limitée.

L'absence de germes fixateurs d'azote, et plus particulièrement les Azotobacter, est aussi une généralité dans la rhizosphère. Dans nos expériences, nous pouvions expliquer ce résultat par la dilution de terre employée qui était assez élevée, mais les travaux de KATZNELSON et Coll. (1956), DASTÈRE (1958), KATZNELSON et STRZELCZYK (1961) CHALVIGNAC (1965), confirment l'absence de stimulation de ces germes dans la rhizosphère. D'après RIVIERE (1959) le stade de développement de la plante et les conditions écologiques interviendraient cependant dans le comportement de ces Azotobacter, modifiant leur proportion autour du système racinaire des plantes.

Enfin, signalons qu'il existe d'autres travaux intéressants sur l'activité métabolique des bactéries rhizosphériques (ZAGALLO et KATZNELSON 1957), mais nous ne pouvons comparer les résultats obtenus car les méthodes employées sont très différentes des nôtres.

Groupements nutritionnels.

Les deux microflores telluriques différentes introduites dans les milieux de culture du Colza nous ont donné un résultat identique : la stimulation des bactéries exigeantes en acides aminés (groupe A), et la disparition des bactéries à très faible pouvoir de synthèse (groupe YS). STRZELCZYK (1961), pour le radis, obtient un résultat semblable puisque dans la rhizosphère, après 21 et 70 jours, il trouve 39 et 46 % de germes du groupe A, alors que dans la terre témoin, il n'en relève respectivement que 26 et 23 %. Par contre, pour cette plante, 30 % des bactéries rhizosphériques appartiennent au groupe YS après 21 jours ou 70 jours. Cette richesse relative est probablement due à leur densité très élevée dans la terre témoin (56 % après 21 jours et 50 % après 70 jours).

Cette dominance des bactéries exigeantes en azote aminé au détriment des germes à pouvoir de synthèse très faible a été souvent signalée : pour la betterave par LOCHHEAD et THEXTON (1947), pour des plantes très diverses par LOCHHEAD et ROUATT (1955), pour le blé par COOK et LOCHHEAD (1959), pour le maïs par TARDIEUX et Coll. (1960 et 1961), pour le coton par SULOCHANA (1962). BALICKA (1958) ainsi que VERONA et Coll. (1966) signalent le même phénomène, mais pour une légumineuse : la vesce, et dans ce cas, nous n'avons peut être plus l'équilibre classique dans la rhizosphère car l'activité des Rhizobium peut s'ajouter à celle des germes rhizosphériques. KATZNELSON et Coll. (1956) et ROUATT (1959), pour des céréales, mettent aussi en évidence la même modification dans la flore rhizosphérique, mais par contre, ils retrouvent encore de nombreux germes très exigeants. Ici aussi, il nous semble que ces résultats soient dûs à leur abondance dans la microflore tellurique initiale (78 % des bactéries présentes dans la terre utilisée par KATZNELSON et Coll. sont du groupe YS et 83 % pour la terre utilisée par ROUATT.)

Nous ne pouvons cependant pas généraliser ce résultat car certains travaux signalent la stimulation des bactéries à pouvoir de synthèse très élevé (groupe B) dans la rhizosphère. C'est le cas de CHALVIGNAC pour le lin (1965) et de VASANTHARAJAN et BHAT pour la mûre (1967). Pour le lin, notons pourtant que cette stimulation s'effectue quand même au dépend des germes très exigeants.

Enfin, citons deux cas très particuliers : pour l'orge et l'avoine, WALLACE et KING (1954) notent ainsi une abondance de germes exigeants en extrait de levure ; et pour le bouleau, dès les premières semaines de sa croissance, IVARSON et KATZNELSON (1960) ne signalent pas de différences appréciables entre les flores tellurique et rhizosphérique. Ces résultats, à notre avis, ne sont pas interprétables.

En conclusion, dans la rhizosphère du Colza, nous retrouvons l'activité élevée des germes ammonifiants et dénitrifiants, l'absence de nitrification, et un pourcentage élevé des bactéries exigeantes en acides aminés, qui caractérisent la microflore rhizosphérique en général. Par contre, l'activité protéolytique semble être plus spécifiquement liée au Colza lui-même. Ces résultats sont en relation étroite avec les analyses biochimiques dont nous avons rendu compte dans le chapitre précédent .

B - LE SPECTRE BACTERIEN DE LA MICROFLORE RHIZOSPHERIQUE DU COLZA

Le but de cette recherche est de préciser la nature des germes telluriques sélectionnés par les sécrétions radicellaires du Colza dès les premiers stades de sa croissance. La principale difficulté de ce type d'analyse réside dans le choix d'une méthode de classification des germes. Dans le sol, les bactéries les plus communes sont en général les Bacillus, les Pseudomonas, Flavobacterium, Achromobacter, et les bactéries corynéformes. C'est BRISBANE et ROVIRA (1961) qui semblent avoir été les premiers à étudier les méthodes pouvant permettre en quelque sorte un relevé des germes présents dans la rhizosphère. Ils ont testé trois méthodes : la classification basée sur les associations de caractères, l'identification par l'utilisation de la clef de SKERMAN basée sur le BERGEY'S MANUAL, et la classification suivant les index d'affinités. Les résultats obtenus confirment la difficulté de ce problème, aucune méthode ne convenant parfaitement.

En ce qui nous concerne, étant donné l'importance prépondérante des germes du genre Arthrobacter dans les microflores utilisées, nous avons adopté une méthode simple basée, au départ, sur des examens microscopiques des souches isolées, après plusieurs temps d'incubation. De ces analyses, nous avons toujours éliminé les actinomycétales et les champignons. Il nous semble d'ailleurs que pour ces microorganismes, il n'y ait pas d'effet rhizosphère positif chez le Colza. Certains travaux effectués à partir d'autres plantes prouvent le contraire, mais nous pensons que dans ce cas, il ne s'agit jamais de rhizosphère jeune.

Dans ce chapitre, nous allons tout d'abord étudier les caractéristiques des Arthrobacter, groupement bactérien dominant dans la rhizosphère du Colza, puis, à partir d'analyses effectuées à l'aide d'autres plantules, nous pourrions déterminer l'importance relative de leur présence dans la rhizosphère.

I - Caractéristiques des bactéries du genre Arthrobacter présentes dans la rhizosphère du Colza.

Les résultats ont été publiés dans les Annales de l'Institut Pasteur de LILLE. (1970, 21).

LES ARTHROBACTER DE LA MICROFLORE RHIZOSPHERIQUE DES PLANTULES DE COLZA

BLONDEAU R.

(Laboratoire de Cryptogamie - Faculté des Sciences de Lille)

De nombreux travaux ont souligné les différences existant entre le nombre de bactéries se développant autour du système racinaire des plantes, constituant la rhizosphère et le nombre de germes se trouvant dans le milieu ambiant.

Pour la plantule de colza, cette évolution quantitative a déjà été étudiée, ainsi que les groupements bactériens physiologiques et nutritionnels présents.

Désirant approfondir cette étude, dans un but aussi bien écologique qu'expérimental, conduisant à la sélection et à l'utilisation de souches pures pour la suite de ce travail, nous avons analysé la flore bactérienne dominante de la rhizosphère des plantules de colza.

L'examen microscopique des souches bactériennes isolées de semis de graines de colza donne souvent des résultats différents suivant que les frottis sont effectués à partir de cultures incubées pendant vingt-quatre heures, ou pendant plusieurs jours. A partir des cultures jeunes : la majorité des souches sont des bâtonnets à gram négatif, alors que les cultures âgées présentent souvent des formes sphériques semblables à des cocci.

Un premier examen plus approfondi, portant sur 50 souches, a confirmé que la plupart des germes isolés de la rhizosphère du colza avaient toutes les caractéristiques principales du genre *Arthrobacter*, classé dans la famille des Corynébactéries.

Afin de prouver que ces *Arthrobacter*, considérés généralement comme des germes autochtones du sol, pouvaient aussi constituer une flore « rhizosphérique », nous avons mis en incubation une terre inculte, à 22 °C, en y incorporant, soit de l'eau stérile, soit des éluats de cultures stériles de colza.

Après trois jours d'incubation, 50 souches bactériennes, isolées à partir de chacune des terres expérimentées sont examinées après coloration de gram.

TABLEAU I

Répartition des groupements morphologiques dans une terre inculte incubée en présence d'eau stérile (T) ou d'exudats racinaires de plantules de colza (R)

	Nombre de souches isolées	Arthro- bacter	Bacillus	Bâtonnets gram+	Bâtonnets gram—	Autres germes
Terre T	50	21	7	7	13	2
Terre R	50	30	1	8	10	1

Les résultats obtenus (Tableau I) prouvent que les exudats radicellaires stimulent les *Arthrobacter*, au dépend, d'ailleurs, des bactéries sporulées.

Dans cette note, nous présentons le résultat de l'étude systématique de 121 souches d'*Arthrobacter* isolées à partir de 4 séries de cultures de graines de colza.

En complément de ce travail, nous avons étudié la possibilité de synthèse de vitamine B₁₂ par ces bactéries, et la production d'acide β indolyl acétique ; substances qui présentent un grand intérêt dans le cadre des interactions nutritionnelles au niveau de la rhizosphère des plantules.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Culture des graines en présence des microflores telluriques.

La culture du colza (variété Crésus) est effectuée dans des tubes suivant une technique mise au point précédemment (3). La solution de Knop diluée de moitié constitue le milieu nutritif.

4 séries de cultures ont été expérimentées.

Dans chaque cas, la microflore tellurique est incorporée après deux jours au milieu de germination des graines, en introduisant dans les tubes de culture 1 ml d'une solution à 1 p. 1 000 d'une terre donnée.

Pour les séries 1 et 2, cette terre provient d'un champ non cultivé. Elle a été conservée suivant une méthode déjà décrite (3) et contenait 33.10^6 germes par gramme.

La 1^{re} série de culture correspond à des semis effectués avec des graines préalablement stérilisées à l'hypochlorite de calcium, alors que pour la seconde, le colza est ensemencé sans traitement préalable.

Les séries 3 et 4 par contre ont été toutes deux ensemencées avec des graines stériles, et la microflore incorporée provient d'une terre cultivée. (Culture précédente : betterave - 64.10^6 bactéries par gramme.

Cependant la série 3 a été placée à 18 °C, comme les deux premières, alors que pour la série 4, la température est réglée à 22 °C.

Enfin, quelle que soit la série envisagée, 40 graines sontensemencées par tube, et ceux-ci sont soumis à un éclaircissement de douze heures par jour.

Isolement des souches et sélection des Arthrobacter.

Pour chacune des séries considérées, cinq jours après l'incorporation des microflores telluriques, les substrats de germination de plusieurs tubes sont agités avec de l'eau stérile de façon à obtenir une suspension au 1/10.

Les dilutions suivantes sont alors préparées et un ensemencement des dilutions adéquates est effectué sur milieu gélosé de Bunt et Rovira. Après incubation à 28 °C, 50 souches sont isolées à partir de chaque série et sont numérotées de C₁ à C₅₀ pour la première série ; C₅₁ à C₁₀₀ pour la seconde, etc.

La sélection des *Arthrobacter* s'effectue par l'examen d'un frottis préparé après un à cinq jours de culture, et coloré par la méthode de gram. Pour les souches dont la détermination reste douteuse après cet examen morphologique, l'étude de quelques caractères biochimiques propres aux *Arthrobacter* permet éventuellement de les conserver.

RÉSULTATS

I. — ÉTUDE SYSTÉMATIQUE DES SOUCHES ISOLÉES.

1° Coloration de gram.

Ces bactéries, toujours très « pléomorphes », apparaissent, dans les stades jeunes, comme des bâtonnets souvent assez courts, à gram négatif. Par contre, les cultures âgées ne présentent généralement plus que des cellules coccoïdes sensiblement toutes de même taille : les cystites, à gram positif. La distinction entre ces deux stades est très nette, et c'est d'ailleurs presque toujours cette caractéristique qui nous a permis de sélectionner les *Arthrobacter*. L'utilisation des milieux décrits par MULDER et ANTHEUNISSE (17) a été rarement nécessaire pour vérifier l'aspect morphologique de nos souches.

2° Exigences nutritionnelles.

Le pouvoir de synthèse des bactéries est un caractère très important en Microbiologie du sol. Il a été défini par ensemencement sur une gamme de 4 milieux de culture retenus parmi les 7 préconisés par LOCHHEAD et CHASE (14) :

- Milieu B : milieu minéral glucosé (1 p. 1 000) ;
- Milieu A : milieu B + 4 p. 1 000 de « Casamino-acid vitamine free » (Difco) ;
- Milieu Y : milieu B + 1 p. 1 000 d'extrait de levure (Difco) ;
- Milieu YS : milieu Y + extrait de terre.

Toutes les souches étudiées se sont développées sur les milieux B ou A. 92 utilisent l'azote minéral, 29 exigent l'azote aminé. Notons cependant que la présence d'acides aminés stimule toujours la croissance des souches capables d'utiliser l'azote minéral.

3° *Mobilité.*

Toutes les souches sont immobiles ou très peu mobiles, après ensemencement par piqûre sur gélose nutritive molle.

4° *Type respiratoire.*

Toutes se comportent comme des aérobies strictes en utilisant la technique des « géloses profondes ».

5° *Température optimum de croissance.*

La croissance est toujours nulle à 37 °C, et peu active à 32 °C. L'optimum se situe entre 24 et 28 °C.

6° *Utilisation des citrates.*

Toutes les souches utilisent les citrates comme seule source de carbone après deux ensemencements sur milieu de Simmons.

7° *Action sur le glucose.*

Sur milieu de Hugh et Leifson, la plupart des *Arthrobacter* isolés présentent une légère oxydation.

8° *Production d'indole.*

Aucune souche ne produit d'indole en milieu peptoné.

9° *Réduction des nitrates en nitrites.*

Sur milieu gélosé contenant du KNO_3 , 54 souches sur les 121 réduisent ces nitrates en nitrites.

10° *Production de SH_2 .*

Aucune souche n'a donné de résultat positif par inoculation dans le milieu de Christensen modifié.

11° *Recherche d'une catalase.*

Tous les *Arthrobacter* isolés sont catalase positif en employant comme réactif H_2O_2 .

12° Recherche d'une amylase.

Tous sont aussi amylase positif, sur milieu gélosé à base d'amidon de riz. Cependant, l'activité amylolytique présente des degrés très variables suivant les souches.

13° Recherche d'une uréase.

Le milieu de Christensen n'est pas utilisable pour ces germes. La recherche directe d'une uréase, par inoculation massive dans le milieu de Ferguson et Hook, suivie d'une incubation à 37 °C a toujours donné un résultat négatif.

14° Recherche d'une gélatinase.

Ce test permet très nettement de distinguer 94 souches gélatinase positif.

15° Résistance aux antibiotiques.

L'action des antibiotiques ayant été utilisée par MEUNIER et SIMON (15) pour l'identification de certains *Arthrobacter*, nous avons aussi analysé le comportement de nos souches. Les résultats obtenus ne permettent cependant pas de les différencier : la presque totalité des souches étant résistantes à l'érythromycine, la pénicilline et la novobiocine, et sensibles à la streptomycine, la néomycine, la kanamycine, l'aureomycine et la tétracycline.

En conclusion, les *Arthrobacter* isolés de la rhizosphère du colza, par certaines de leurs caractéristiques (Mobilité, type respiratoire, action sur le glucose, non production d'indole et d'uréase) correspondent bien à la définition du genre donné dans le « BERGEY'S MANUAL » (5).

Par contre, dans l'état actuel de nos connaissances sur les *Arthrobacter*, il est impossible de leur donner des noms d'espèce. Ainsi, nous préférons, pour l'instant, grouper nos souches en utilisant trois critères qui semblent les plus valables et qui, de plus, sont classiques en systématique bactérienne : la source d'azote utilisable (N minéral ou N aminé), la présence d'une gélatinase, et la possibilité de réduire les nitrates en nitrites.

Ces résultats sont consignés dans le tableau II.

II. — SYNTHÈSE DE VITAMINE B₁₂.

Les souches sont ensemencées dans un milieu minéral (K₂HPO₄, 1 g ; KNO₃, 0,5 g ; MgSO₄ · 7 H₂O, 0,2 g ; CaCl₂, 0,1 g ; NaCl, 0,1 g ; FeCl₃, 6 H₂O, 0,01 g ; CoCl₂ · 6 H₂O, 0,008 g ; pour 1 litre) additionné de 1 g par litre de glucose et 4 g par litre de « Casamino Acid Vitamine free » (Difco).

Après incubation à 28 °C pendant quarante-huit heures, les cultures sont centrifugées et les surnageants sont stérilisés.

La recherche de la présence de cyanocobalamine dans ces milieux de culture est effectuée par la méthode biologique, en utilisant comme « souche test » *Ochromonas malhamensis* ATCC 11.532, suivant la technique de FORD (9).

TABLEAU II

Caractéristiques des Arthrobacter isolés de la rhizosphère du colza

Expé- riences	Nombre de souches isolées	Nombre l'Arthro- bacter	Nm				Na			
			G--		G+		G--		G+	
			N+	N-	N+	N-	N+	N-	N+	N--
1	50	26	12	5	6	0	3	0	0	0
2	50	23	14	4	2	0	2	0	1	0
3	50	40	3	17	4	6	0	6	3	1
4	50	32	4	11	0	4	0	13	0	0
TOTAL	200	121	33	37	12	10	5	19	4	1

Nm = besoin en azote minéral.

Na = besoin en azote aminé.

G+ = présence d'une gélatinase.

G-- = absence d'une gélatinase.

N+ = réduction des nitrates en nitrites.

N-- = pas de réduction des nitrates en nitrites.

Sur les 121 surnageants ainsi analysés, 99 contenaient plus de 10 µµg de cyanocobalamine par millilitre, et 32 de ceux-ci, plus de 100 µµg par millilitre.

Cette synthèse vitaminique par des germes rhizosphériques présentant un grand intérêt, soit pour la nutrition des plantes, soit pour la flore bactérienne du sol à faible pouvoir de synthèse; nous avons étudié la cinétique de la production de vitamine B₁₂ par une souche d'*Arthrobacter* (C 24), en fonction de la durée d'incubation.

Cette souche est incubée à 28 °C en culture agitée, dans le milieu précédent contenant des sels, du glucose et des acides aminés.

Après 10, 20, 30, 50, 78, 118 et 166 heures d'incubation, la densité optique des cultures est mesurée et le dosage vitaminique est effectué avec *Ochromonas malhumensis*.

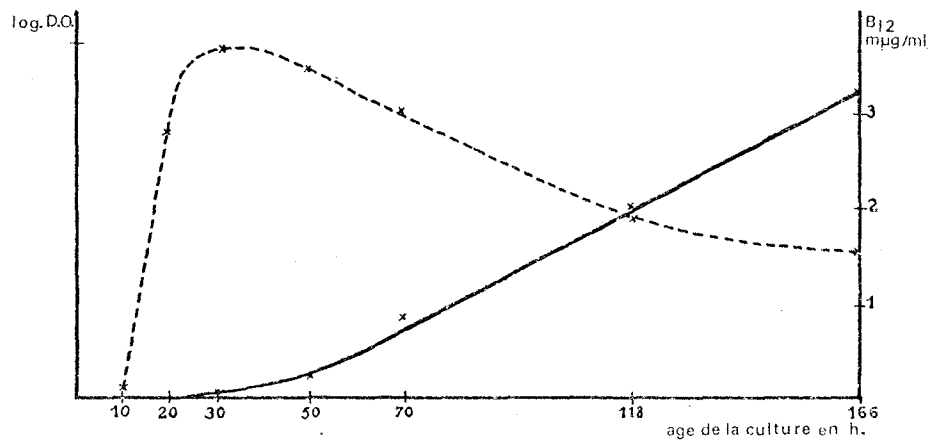
Les résultats, présentés dans le graphique 1, indiquent que la présence de cyanocobalamine dans le milieu de culture n'est décelable qu'après trente heures d'incubation, c'est-à-dire au moment où la densité bactérienne est très élevée. Ensuite, la concentration augmente rapidement, pour atteindre 3.22 µµg par millilitre après cent-seize heures. Cette vitamine B₁₂ ne serait donc pas libérée dans le milieu de culture pendant la phase de croissance active de la bactérie, mais plutôt au moment de la lyse des cellules.

III. — PRODUCTION D'ACIDE β INDOLYL ACÉTIQUE.

Cette synthèse d'acide β indolyl acétique (AIA) a été recherchée dans des milieux de culture contenant comme précurseur : le tryptophane.

L'inoculation des souches s'effectue dans le milieu de BERTHELOT et AMOUREUX (1), contenant 0,5 g par litre de tryptophane ajouté séparément, après stérilisation sur filtre, et, en plus, 0,25 g par litre de « Casamino Acid » destiné, en particulier, à stimuler la prolifération des souches exigeantes en N. aminé.

Les cultures sont incubées à 28 °C pendant quarante heures, puis sont centrifugées, et la présence d'AIA est caractérisée directement, à partir du surnageant de centrifugation, par le réactif de Salkowski, modifié par PILET (19).



GRAPHIQUE 1

Synthèse de vitamine B₁₂ rejetée dans le milieu de culture par la souche C₂₄ en fonction de l'âge de la culture.

... D. O. de la culture.

— Vitamine B₁₂.

Les 121 souches d'*Arthrobacter* ont ainsi été analysées, et toutes ont donné un résultat positif.

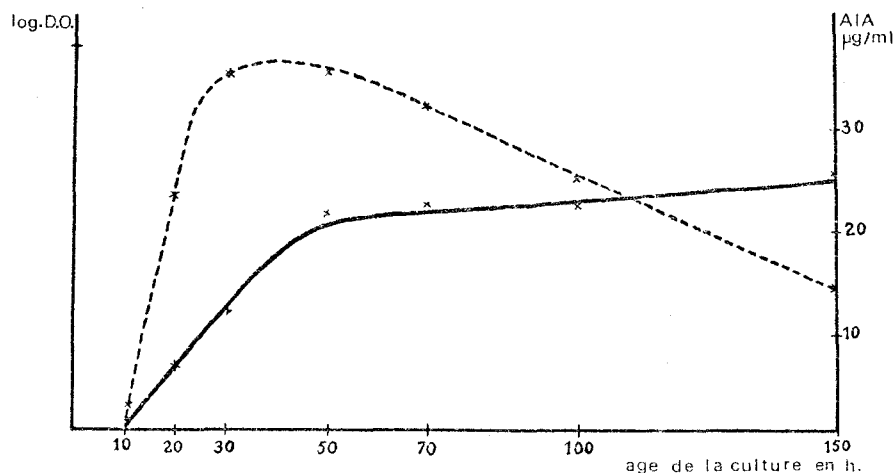
Comme précédemment, pour la cyanocobalamine, nous avons pensé qu'il serait aussi intéressant d'étudier la cinétique de la production d'AIA en fonction de la durée d'incubation. Pour cette expérience, nous avons choisi la souche C 89, qui avait donné une coloration intense avec le réactif de Salkowski lors de la première analyse. Elle est inoculée dans des erlens contenant 100 ml du milieu précédemment décrit, et l'incubation s'effectue à 28 °C avec agitation.

Après 10, 20, 30, 50, 70, 100 et 150 heures d'incubation, la densité optique est mesurée, les cultures sont centrifugées et les surnageants sont stérilisés par filtration. Ils sont conservés à l'obscurité, à 4 °C jusqu'au moment de l'analyse.

Les sept surnageants sont alors acidifiés à pH 2,8 (avec HCl N) et l'A I A est extrait par de l'éther dépourvu de peroxydes, pendant trois opérations successives. Les extraits étherés sont ensuite lavés, concentrés à sec, et enfin repris par 5 ml d'éthanol. (Toutes ces opérations s'effectuent à l'abri de la lumière.)

Une analyse chromatographique, à 25 °C et à l'obscurité sur papier Whatman n° 1 avec l'éluant Isopropanol — NH₃ — eau (8/1/1 v/v) permet de contrôler le Rf de la substance extraite, après révélation par le réactif de Salkowski. Ce Rf = 0,43 correspond à celui de l'A I A témoin.

L'analyse quantitative s'opère après électrophorèse sur papier. L'extrait alcoolique contenant l'A I A est déposé du côté de la cathode, et l'électrophorèse s'effectue à 110 V pendant neuf heures, à l'obscurité. (Solution utilisée : tampon de Sorensen pH 7). L'A I A migrant du côté de l'anode, son emplacement est repéré sur les électrophorégrammes grâce à un témoin. Cette zone est alors découpée, éluee par de l'eau, et le dosage définitif s'effectue à partir de cet éluat, toujours par le réactif de Salkowski. La réaction colorée est enregistrée au spectrophotomètre ($\lambda = 530 \text{ m}\mu$), et la concentration définitive est calculée par rapport à une courbe de référence préparée à partir d'une solution d'A I A synthétique.



GRAPHIQUE 2

Production d'acide β -indolyl-acétique par la souche C₈₈, en fonction de l'âge de la culture.

..... D. O. de la culture.

—— A I A.

Les résultats (graphique 2) montrent que la conversion du tryptophane en A I A se produit quand le taux de croissance de la culture bactérienne est élevé. Lorsque la culture est en phase de déclin, la concentration en A I A se maintenant à une valeur à peu près constante, aucune dégradation ne s'opère.

Enfin, la quantité d'A I A produit : 21,5 μ g par millilitre après cinquante heures d'incubation est très importante. En effet, KATZNELSON et SIROIS (13), pour *A. globiformis* par exemple, ne trouvent que 120 μ g par litre d'A I A après quarante-huit heures d'incubation dans un milieu contenant du tryptophane, et 10 μ g par litre lorsqu'il est absent. Par contre, HENNEQUIN et BLACHERE (12), utilisant un *Arthrobacter* sp., trouvent, après sept jours de culture dans un milieu sans tryptophane, 250 μ g par litre d'A I A.

Soulignons toutefois que ces auteurs utilisent le test coléoptile et mésocotyle d'avoine pour leur dosage.

DISCUSSION ET CONCLUSION

La présence des *Arthrobacter* dans la rhizosphère du colza permet d'expliquer l'importante activité protéolytique et amylolytique, notée lors de l'étude des groupements physiologiques (2). Leur pouvoir de synthèse élevé peut aussi être mis en parallèle avec l'absence de l'utilisation des vitamines, éliminées par le système racinaire des plantules (4).

Les caractéristiques des souches que nous avons isolées sont d'ailleurs assez voisines de celles de MULDER *et al.* (18) provenant de différents sols hollandais et nigériens, et de celles de GOUNOT, (10), de limons souterrains. Remarquons toutefois que les *Arthrobacter* des sols hollandais et nigériens sont exigeants en vitamines, le plus souvent en biotine, alors que ceux des limons souterrains synthétisent de nombreuses vitamines hydrosolubles, mais rarement la cyanocobalamine.

Nous ne pouvons cependant considérer ces *Arthrobacter* comme des germes caractéristiques de la rhizosphère des plantes. Certains auteurs ont déjà signalé leur présence ou leur intérêt autour du système racinaire des plantes : SPERBER et ROVIRA (25) trouvent ainsi que 63 p. 100 des bactéries de la rhizosphère du trèfle et 78 p. 100 de celle du ray grass peuvent être identifiées comme *Arthrobacter* ou *Nocardia*; MITCHELL et HURWITS (16) ont pu aussi en isoler de la rhizosphère de tomate ou du riz.

Mais la majorité des chercheurs considèrent plutôt la famille des Pseudomonadacées comme flore caractéristique de la rhizosphère : RIVIÈRE (20) ROUATT et KATZNELSON (21), CHALVIGNAC (6), ULJASHOVA (26), SKYRING et QUADLING (23).

Certains même, comme CHAN et KATZNELSON (7 et 8) et SIEBURTH (22) en expérimentant, à partir de souches pures, des cultures mixtes, prouvent l'existence d'un principe inhibiteur, émis par les *Pseudomonas*, qui ralentit la croissance des *Arthrobacter* et peut même provoquer leur agglutination.

Par contre, l'inhibition des germes sporulés, que nous avons noté chez le colza, a été aussi remarqué par la plupart des auteurs précédemment cités, ainsi que par GYLLEMBERG (11), SMALIJ (24) et VASANTHARAJAN et BHAT (27). Que la flore dominante de la rhizosphère soit représentée par des *Pseudomonas* ou des Corynébactéries, l'effet serait donc, du point de vue écologique, identique : c'est-à-dire une diminution relative des Sporulées ou une inhibition proprement dite.

Afin de concilier nos résultats relatifs à la flore rhizosphérique, avec les travaux effectués antérieurement et aboutissant à un résultat différent, nous pouvons émettre deux hypothèses : soit que la microflore rhizosphérique est

spécifique de la plante ou des différents stades de développement de cette plante, soit que la composition initiale de la microflore tellurique détermine en partie le spectre bactérien de la flore rhizosphérique.

Nous essayons actuellement de répondre à ce problème en cultivant différentes graines en présence d'une même flore tellurique.

RÉSUMÉ

La microflore rhizosphérique des plantules de colza est caractérisée par un enrichissement en *Arthrobacter*, au détriment des germes sporulés. Le pouvoir de synthèse de ces Corynébactéries est généralement élevé. En particulier, leurs filtrats de culture contiennent de la vitamine B₁₂ et, avec le tryptophane comme précurseur, ils produisent des teneurs élevées en acide β -indolyl-acétique.

SUMMARY

The rhizospheric microflora of colza seedlings is characterized by an increase of *Arthrobacter*, correlated with a relative decrease of sporelling germs. Those corynebacteria have a generally great synthesis power. Especially, the filtra of the culture contain vitamin B₁₂, and, with tryptophan as a precursor, they produce great amount of β indolyl acetic acid.

REMERCIEMENTS

Nous remercions M. OCHIN pour l'aide qu'il nous a apportée au début de ce travail.

BIBLIOGRAPHIE

1. — BERTHELOT A. et AMOUREUX G. Sur la formation d'acide indole-3-acétique dans l'action de *Bacterium tumefaciens* sur le tryptophane. *C.R. Acad. Sci. (Paris)*, 1938, 266, 537-540.
2. — BLONDEAU R. Activité biologique de la microflore autour du système racinaire du colza (*Brassica napus*) pendant les premiers stades de sa croissance. *Bull. Soc. Bot. Nord Fr.*, 1966, 19, 27-36.
3. — BLONDEAU R. Technique de culture pour l'étude des interactions microbiennes au niveau du système racinaire des plantules. *Bull. Soc. Bot. Nord Fr.*, 1963, 21, 99-104.
4. — BLONDEAU R. Cinétique de l'évolution des acides aminés et des vitamines hydrosolubles dans la rhizosphère des plantules de colza. *C.R. Acad. Sci. [D] (Paris)*, 1968, 266, 2017-2020.
5. — BREED R. S., MURRAY E. G. D. and SMITH N. R. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 7^e édit., Williams and Wilkins, Baltimore, 1957.
6. — CHALVIGNAC M. A. *Contribution à l'étude de la rhizosphère du lin*. Thèse, Paris, 1965, 127 p.

7. — CHAN E. C. S. and KATZNELSON H. Growth interactions of *Arthrobacter globiformis* and *Pseudomonas* sp. in relation to the rhizosphere effect. *Canad. J. Microbiol.*, 1961, **7**, 759-767.
8. — CHAN E. C. S., KATZNELSON H. and ROUATT J. W. The influence of soil and root extracts on the associative growth of selected soil bacteria. *Canad. J. Microbiol.*, 1963, **9**, 187-197.
9. — FORD J. E. The microbiological assay of vitamin B₁₂. The specificity of the requirement of *Ochromonas malhamensis* for cyanocobalamin. *Brit. J. Nutr.*, 1953, **7**, 299-306.
10. — GOUNOT A. M. *La microflore des limons argileux souterrains : son activité productrice dans la biocoenose cavernicole*. Thèse, 1967.
11. — GYLLENBERG H. The « rhizosphere effect » of graminaceous plants in virgin soils. *Physiol. Plant.*, 1955, **8**, 644-652.
12. — HENNEQUIN J. R. et BLACHÈRE H. Recherches sur la synthèse de phyto-hormones et de composés phénoliques par *Azotobacter* et des bactéries de la rhizosphère. *Ann. Inst. Pasteur*, 1966, **111**, 89-102.
13. — KATZNELSON H. and SIROIS J. C. Auxin production by species of *Arthrobacter*. *Nature (London)*, 1961, **191**, 1323-1324.
14. — LOCHHEAD A. G. and CHASE F. E. Qualitative studies of soil microorganisms. V. Nutritional requirements of the predominant bacterial flora. *Soil. Sci.*, 1943, **55**, 185-195.
15. — MEUNIER R. et SIMON P. Essai d'identification de deux souches d'*Arthrobacter* par l'étude de deux caractères antigéniques et de leur résistance aux antibiotiques. *Ann. Inst. Pasteur*, 1963, **165**, 275-281.
16. — MITCHELL R. and HURWITZ E. Suppression of *Phytophthora* by lytic rhizosphere bacteria. *Phytopath.*, 1965, **55**, 156-158.
17. — MULDER E. G. et ANTHEUNISSE J. Morphologie, physiologie et écologie des *Arthrobacter*. *Ann. Inst. Pasteur*, 1963, **165**, 46-74.
18. — MULDER E. G., ADAMSE A. D., ANTHEUNISSE J., DEINEMA H., WOLDENDORP J. W. and ZEVENHUIZEN L. P. T. M. The relationship between *Brevibacterium linens* and bacteria of the genus *Arthrobacter*. *J. Appl. Bact.*, 1966, **29**, 44-71.
19. — PILET P. E. Dosage photocolorimétrique de l'acide β -indolyl-acétique : application à l'étude des auxines-oxydases. *Revue générale de Botanique*, 1957, **64**, 106.
20. — RIVIÈRE J. Action des microorganismes de la rhizosphère sur la croissance du blé. I. Répartition des genres et des groupes nutritionnels. *Ann. Inst. Pasteur*, 1961, **101**, 611-618.
21. — ROUATT J. W. and KATZNELSON H. A study of the bacteria on the root surface and in the rhizosphere soil of crop plants. *J. Appl. Bact.*, 1961, **24**, 164-171.
22. — SEBURTH J. McN. Inhibition and agglutination of *Arthrobacter* by *Pseudomonas*. *J. of Bact.*, 1967, **93**, 1911-1916.
23. — SKYRING G. W. and QUADLING C. Soil bacteria : comparisons of rhizosphere and non rhizosphere populations. *Canad. J. Microbiol.*, 1969, **15**, 473-488.
24. — SMALLIJ V. T. Influence des sécrétions des racines de blé sur le développement des bactéries de la rhizosphère (en ukrainien). *Mikrobiol. Zh. ukrain. R. S. R.*, 1960, **22**, 13-21.
25. — SPERBER J. I. and ROVIRA A. D. A study of the bacteria associated with the roots of subterranean clover and wimmera rye-grass. *J. Appl. Bact.*, 1959, **22**, 85-95.
26. — ULJASHOVA R. M. La composition spécifique de la microflore en culture hydroponique et en terre, de la tomate (en russe). *Mikrobiologija S. S. S. R.*, 1966, **35**, 871-877.
27. — VASANTHARAJAN V. N. and BHAT J. V. Interrelations between soil microorganisms and mulberry. I. Phytohormone production by soil and rhizosphere bacteria and their effect on plant growth. *Plant and Soil*, 1967, **27**, 261-272.

II - Etude comparée du spectre bactérien de la rhizosphère du Colza et de quelques autres plantules.

Cette étude qui est destinée à répondre à la question formulée dans la conclusion de la publication précédente, a été effectuée avec la collaboration de S. SOUMARE (1970). Il s'agit en effet de déterminer si les caractéristiques de la microflore rhizosphérique du Colza, qui semblent assez particulières étant donné la densité élevée des Arthrobacter, sont la conséquence d'une action particulière et spécifique du Colza, ou si elles sont dues au spectre bactérien propre de la microflore tellurique initiale. Par la même occasion, nous suivrons avec intérêt le comportement des germes sporulés dans la rhizosphère puisque chez le Colza, nous avons déjà noté que leur nombre diminuait dans des proportions très nettes. Nous avons donc analysé la microflore rhizosphérique de plantules, très différentes les unes des autres, dont l'une, le Colza, nous sert en quelque sorte de témoin. Nous avons aussi changé les modalités expérimentales dans ce travail, afin de nous placer dans des conditions écologiques plus strictes. En effet, les expériences que nous présentons ici sont pratiquées en deux temps : dans un premier temps, les graines sont placées en germination stérile, et après développement suffisant des plantules, les excréments racinaires sont recueillis et concentrés. Dans un deuxième temps, une terre dite "expérimentale", choisie en fonction de l'étude envisagée, est imbibée par ces excréments et mise en incubation pendant un certain temps. Finalement, les modifications apportées au spectre microbien de la microflore tellurique initiale sont analysées en étudiant plus particulièrement l'évolution des Arthrobacter et des germes sporulés aérobies dont la caractérisation est assez facile, ainsi que celle des Pseudomonas.

Enfin, en fonction des résultats obtenus, nous avons aussi étudié le comportement en culture pure ou mixte, de quelques souches sélectionnées parmi ces trois groupements bactériens et inoculées à des solutions d'excréments racinaires de Colza ou d'extrait de terre.

1 - Matériel et Méthodes :

a) Choix de la terre "expérimentale" :

Afin d'étudier dans de bonnes conditions expérimentales le problème antérieurement posé, nous avons essayé de choisir, comme source de microflore tellurique, une terre contenant des proportions voisines d'Arthrobacter, de germes sporulés et de Pseudomonas. Après avoir analysé plusieurs terres de nature et d'origine différentes, l'une d'entre elles a finalement été retenue. Elle provient d'un champ inculte depuis plusieurs années et contient, par gramme, $2,6 \cdot 10^6$ bactéries dont 36 p.100 d'Arthrobacter, 30 p.100 de germes sporulés et 16 p.100 de Pseudomonas. Avant analyse, cette terre a été séchée dans une étuve à ventilation, puis passée sur des tamis, de façon à ne conserver que les fines particules donnant une masse homogène.

b) Culture des plantules et préparation des excréations :

Quatre types de graines appartenant à des familles très différentes ont été choisies : une crucifère : le Colza (Brassica napus oleifera), une linée : le lin (linum usitatissimum), une papilionacée : le trèfle (Trifolium arvense) et une graminée : le blé (Triticum sativum).

Ces graines, après stérilisation de leur surface par une solution d'hypochlorite de calcium, suivie de plusieurs lavages avec de l'eau stérile, sont ensemencées simultanément dans deux séries de tubes de culture, correspondant à des modalités expérimentales différentes :

- d'une part dans des tubes spéciaux décrits antérieurement (page 12) et contenant en particulier du sable de Fontainebleau ;

- d'autre part dans des tubes plus classiques, en culture hydroponique, les graines étant disposées à la surface du liquide nutritif, sur du coton hydrophile.

Dans les deux cas, la solution minérale de KNOP diluée au demi, sert de milieu nutritif et les germinations s'effectuent en conditions stériles dans une pièce régulée à 18°C avec un éclaircissement de 12 heures par jour.

Après 10 jours de germination, les excréations racinaires des plantules sont récupérées, soit par élution du substrat de culture s'il s'agit des tubes contenant le sable, soit par simple prélèvement du milieu de cul-

ture, s'il s'agit des cultures hydroponiques.

Ensuite, les solutions récupérées sont concentrées sous vide jusqu'à un volume tel que 1 ml corresponde aux excréments de 10 plantules, puis stérilisées par filtration,

c) Incubation de la terre "expérimentale" :

Afin de permettre une aération suffisante, cette incubation en présence des différents excréments racinaires s'effectue dans des tubes stériles présentant, à environ 1 cm de leur base, un disque en verre fritté. La terre "expérimentale" choisie est répartie dans ces tubes à raison de 10 g par tube et des fractions de 2,5 ml des exsudats stériles des 8 lots de plantules sont finalement incorporées à cette terre. Des témoins sont aussi réalisés parallèlement avec 2,5 ml d'eau stérile. Les tubes, recouverts de papier d'étain, sont incubés à 18°C jusqu'à analyse.

d) Analyse du spectre bactérien :

Après 5 jours d'incubation, des suspensions dilutions sont préparées à partir du contenu des différentes séries de tubes expérimentés et les dilutions adéquates sont étalées, suivant la méthode habituelle, sur le milieu gélosé de BUNT et ROVIRA.

Six à huit jours après incubation à 28°C, 50 souches bactériennes sont isolées à partir de chaque série expérimentée et repiquées sur géloses enrichies de BUNT et ROVIRA.

L'identification des Arthrobacter, germes sporulés et Pseudomonas s'effectue ensuite en considérant certains critères déterminants l'examen de frottis colorés par la méthode de Gram après un et cinq jours de culture, permet ainsi de reconnaître les Arthrobacter grâce à l'apparition de cystites dans les cultures âgées. Des examens complémentaires tels que le type respiratoire, l'action sur le glucose et la mobilité, justifient, dans certains cas, les résultats douteux.

Les germes sporulés aérobies sont presque toujours caractérisés uniquement par l'observation des frottis préparés après un et cinq jours d'incubation, la présence des endospores étant souvent facile à déceler.

Quant aux Pseudomonas, la coloration de Gram, la recherche de la cytochrome oxydase, la mobilité, l'action sur le glucose et parfois la pigmentation, permettent leur détermination.

2 - Résultats expérimentaux :

Le tableau I donne le résultat des numérations de la microflore bactérienne présente dans la terre "expérimentale" après traitement avec les excréments racinaires. Ces numérations sont toujours obtenues par ensemencement de suspensions-dilutions de la terre sur le milieu gélosé de BUNT et ROVIRA.

Origine des excréments racinaires	Type de culture	Nombre de bactéries
Eau.....	-	54.10^6
Colza.....	sur sable	59.10^7
	hydroponique	$13,5.10^7$
Lin.....	sur sable	$13,2.10^8$
	hydroponique	24.10^7
Trèfle.....	sur sable	$4,1.10^8$
	hydroponique	$14,5.10^8$
Blé.....	sur sable	16.10^8
	hydroponique	$8,4.10^8$

TABLEAU I.

Flore bactérienne totale dans la terre incubée en présence d'eau (témoin) ou en présence d'excréments racinaires. (Les chiffres se rapportent au nombre de germes par gramme de terre expérimentée).

Le tableau II donne les proportions respectives des Arthrobacter, Pseudomonas et des germes sporulés colonisant la terre expérimentée. Ce tableau indique aussi le nombre de bâtonnets à Gram négatif, mais différent des Pseudomonas, le nombre de bâtonnets à Gram positif, mais ne présentant pas de spore, et enfin le nombre de bactéries non classées qui sont surtout des cocci, des coccobacilles, des formes polymorphes ou des germes à Gram indéterminé.

Origine des excréta tats racina ires	Type de culture	Total des souches utilisées						
			Ar	Ps,	Sp	b(-)	b(+)	Div.
Eau	-	50	15	5	14	4	5	7
Colza	sur sable	50	37	3	2	2	2	4
	hydroponique	50	39	2	3	1	0	5
Lin	sur sable	50	30	4	3	4	1	8
	hydroponique	50	33	3	3	3	2	6
Trèfle	sur sable	50	38	6	0	1	1	4
	hydroponique	50	36	7	0	5	0	2
Blé	sur sable	50	43	3	0	0	1	3
	hydroponique	50	39	3	0	2	1	5

TABLEAU II.

Répartition des groupements bactériens dans la terre incubée en présence d'eau (témoin) ou en présence des excrétaats racinaires.

Ar = Arthrobacter

b(-) = bâtonnets à Gram négatif

Ps = Pseudomonas

b(+) = bâtonnets à Gram positif

Sp = Bactéries sporulées

Ces résultats prouvent tout d'abord que l'"effet rhizosphère" se produit normalement dans ces conditions expérimentales particulière (tableau I)

D'autre part, en considérant l'évolution du spectre bactérien de la microflore tellurique initiale en fonction des exsudats racinaires (tableau II), il est possible d'en tirer les conclusions suivantes :

a) Quelle que soit l'origine de ces exsudats (culture sur sable ou culture hydroponique), les résultats obtenus sont pratiquement identiques. Un total de 50 isollements est donc suffisant pour obtenir une répartition significative des groupements bactériens ;

b) Quelle que soit la nature de ces exsudats (Colza, Lin, Trèfle, Blé) la même évolution du spectre microbien est retrouvée, c'est à dire une stimulation des Arthrobacter et une inhibition des germes sporulés. En ce qui concerne les Pseudomonas, les résultats obtenus sont difficilement interprétables

car leur proportion, qui a diminué dans la terre témoin, est assez faible. Aucune stimulation n'est cependant observée dans les terres "traitées".

3 - Analyse des résultats :

Indépendamment de la nature des excréments racinaires, nous pouvons ainsi considérer les Arthrobacter comme germes d'origine rhizosphérique. En vue de trouver une explication à ce phénomène, nous avons essayé d'en approfondir l'étude par l'incubation de quelques souches pures, précédemment isolées et choisies parmi les Arthrobacter, les Pseudomonas et les Bacillus, dans des extraits de terre ou des exsudats racinaires. Les extraits de terre ont été obtenus par autoclavage à 110° C pendant 20 mn, d'un mélange à parties égales de terre et d'eau distillée. Les exsudats ont été recueillis à partir de cultures stériles de graines de Colza. Chacune de ces solutions, stérilisée par filtration et ensemencée avec des inoculats prélevés en phase exponentielle de croissance obtenues à partir de chaque souche, révèle un comportement identique des Arthrobacter et des Pseudomonas, à l'opposé des germes sporulés. En effet, le taux de croissance des bactéries appartenant aux deux premiers genres est plus élevé lorsqu'elles sont incubées dans une solution d'exsudats racinaires que dans un extrait de terre. Par contre, pour les Bacillus, leur taux de croissance est toujours plus élevé dans l'extrait de terre.

Ces résultats nous conduisent donc à considérer les Arthrobacter et Pseudomonas comme germes rhizosphériques ; les Bacillus comme germes typiquement telluriques. Ils permettent aussi de donner une interprétation aux résultats obtenus précédemment (Tableau II) : les Arthrobacter, à croissance plus rapide, se multipliant rapidement dans les sites rhizosphériques, aux dépens des germes sporulés.

Cependant, la faible proportion de Pseudomonas, dans la microflore rhizosphérique, obtenue à partir de notre terre "expérimentale", ne trouve pas encore son explication. Nous avons ainsi effectué, dans les mêmes conditions que précédemment, non plus des cultures pures de souches, mais des cultures mixtes : Arthrobacter-Pseudomonas, Arthrobacter-Bacillus, Pseudomonas-Bacillus. Les souches employées ont été sélectionnées de façon à pouvoir les numérer sélectivement à partir d'un mélange, soit en utilisant comme

critère de reconnaissance la résistance à un antibiotique, soit la faculté d'utiliser un sucre donné.

Ces numérations sélectives effectuées après 24 h et 48 h d'incubation dans un extrait de terre ou un exsudat de Colza, nous ont permis de constater un comportement analogue des Arthrobacter et des Pseudomonas vis-à-vis d'un Bacillus, c'est à dire une prédominance des Bacillus en culture mixte effectuée en présence d'un extrait de terre et une prédominance des Arthrobacter ou Pseudomonas en culture mixte effectuée dans un exsudat.

Par contre, dans une culture mixte d'un Arthrobacter avec un Pseudomonas, quel que soit le milieu d'incubation, aucun germe ne semble prédominant sur l'autre. En particulier le phénomène observé par CHAN et KATZNELSON (1961 et 1963) puis par SIEBURTH (1967) concernant l'agglutination des Arthrobacter par des Pseudomonas, n'a pu être vérifié avec nos souches. Il semblerait donc que dans le cadre de notre expérimentation, l'absence de stimulation des germes du genre Pseudomonas dans la rhizosphère soit due surtout à la proportion élevée de la microflore tellurique de départ en Arthrobacter.

Avant de conclure définitivement cette étude, nous avons encore effectué une expérience supplémentaire, qui est en quelque sorte une expérience de contrôle. En effet, les résultats consignés dans le tableau I et II pouvaient être interprétés d'une façon différente : le témoin, dans ces expériences, est une terre incubée en présence d'eau ; or, lorsque cette même terre est incubée en présence d'excrétats racinaires, on apporte en même temps qu'eux les sels minéraux de la solution nutritive de KNOP qui n'ont pas été utilisés par la plante, et qui sont peut être en quantité appréciable puisque les éluats de culture sont concentrés avant l'incorporation à la terre "expérimentale". Aussi, on pouvait se demander si les Arthrobacter n'avaient pas été stimulés par la présence de ces sels plutôt que par les excréments racinaires des plantules.

Afin d'éliminer cette éventualité, nous ne pouvions pas prévoir une expérience comportant des cultures de plantules toujours effectuées en présence de solution nutritive car dans ce cas, il n'est pas possible de calculer la concentration des sels à incorporer dans l'eau afin d'obtenir le vrai témoin.

Une autre solution consistait à laisser croître les plantes suffisamment longtemps de façon à ce que la totalité des sels de la solution nutritive soit utilisée. Elle présente cependant un inconvénient car dans ces conditions, on obtient une dessiccation du substrat de germination suivie de modifications physiologiques au niveau des racines, perturbant les modalités de l'excrétion.

Aussi, nous avons choisi la solution suivante, qui consiste à conserver comme témoin l'eau stérile, mais en effectuant des cultures de plantes en milieu hydroponique non nutritif, c'est à dire uniquement avec de l'eau. Dans ces conditions, on arrive bien sur très rapidement à un arrêt du développement des plantules sitôt les réserves de la graine utilisées, et avec le matériel végétal utilisé : le Colza, après 7 jours de culture, le milieu est récupéré et l'expérience se poursuit comme précédemment.

La terre "expérimentale" provenait d'un champ inculte et contenait $30,5 \cdot 10^6$ bactéries par gramme. Parmi les 30 bâtonnets à Gram négatif isolés de cette terre, 10 étaient des Pseudomonas pigmentés et 6 des Flavobacterium. Pour l'analyse effectuée après incubation de cette terre en présence d'eau ou d'excrétats, nous n'avons cependant plus fait de différenciation entre les Pseudomonas et les autres germes à Gram négatif. Les résultats obtenus sont indiqués dans le tableau III.

Type d'expérience	Nombre de souches isolées	Ar	Sp	b(-)	b(+)	Divers
"Terre expérimentale"	100	43	13	30	6	8
"Terre expérimentale" + eau.	100	30	29	18	14	9
"Terre expérimentale" + excréats de Colza.	100	60	9	9	8	14

TABLEAU III.

Répartition des groupements bactériens dans une "terre expérimentale" et dans cette même terre incubée en présence d'eau ou en présence d'excrétats de Colza provenant d'une culture en milieu aqueux non nutritif.

Ces résultats prouvent que la stimulation des Arthrobacter est bien en relation avec la présence des substances excrétées par le système racinaire des plantules. Pour les germes sporulés, nous retrouvons aussi la diminution relative de leur population. Les germes rhizosphériques que nous isolons étant proportionnellement plus exigeants en acides aminés que les germes telluriques correspondants, nous avons donc maintenant deux arguments qui prouvent que nos conditions expérimentales conviennent pour ce type d'analyse .

En conclusion de ce paragraphe relatif à l'étude du spectre bactérien de la rhizosphère de quelques plantules d'espèce différente, nous pouvons confirmer que la stimulation des bactéries du genre Arthrobacter ne dépend pas de la nature de l'exsudat racinaire, et qu'elle peut être généralisée à toutes les rhizosphères. Nous pensons néanmoins que le spectre microbien de la microflore rhizosphérique est en relation étroite avec celui de la microflore tellurique initiale.

III - Discussion générale et conclusion.

La densité élevée en Arthrobacter des microflores rhizosphériques que nous avons étudiées est donc un résultat qui, à priori, est assez surprenant puisque ces germes ne sont pas typiquement rhizosphériques. Nous ne pouvons cependant pas mettre en cause nos conditions expérimentales puisque, non seulement nous y avons déjà introduit une variante en incubant une terre en présence d'exsudats récoltés après croissance des plantules, mais des travaux poursuivants actuellement prouvent aussi que dans des terres cultivées, la densité de ces corynébactéries est plus élevée que dans les terres incultes ou sans végétation.

Nous avons signalé, page 90, que certains chercheurs avaient déjà noté leur pourcentage élevé dans des rhizosphères. PETERSON et Coll. (1965 et 1967) notent, à leur propos, un phénomène curieux : en effet, dans la rhizosphère d'un blé, ils trouvent que ceux-ci sont nombreux, uniquement quand les plantes se développent en présence d'une flore fongique pathogène. Dans le cas d'un lin cultivé dans une terre non infectée cette fois, ils isolent de même plus d'Arthrobacter dans la zone rhizosphérique d'une variété résistante à Fusarium oxysporum que dans la rhizosphère d'une variété sensible, où dominent encore les Pseudomonas et Flavobacterium. Nous reviendrons par la suite sur ce problème intéressant de la spécificité variétale de la microflore rhizosphérique.

Nous avons aussi signalé plus haut un certain nombre de références concernant la présence de Pseudomonas ou de Pseudomonadacées dans les rhizosphères. A celles-ci, il faut ajouter trois travaux très récents : celui de LEVAL et REMACLE (1969) qui notent des proportions excessives de Pseudomonas dans des terres rhizosphériques de peuplier, celui de RIVIERE et Coll. (1970) qui isolent 69,5 % de bâtonnets à Gram négatif dans la rhizosphère du maïs et enfin celui de SANDS et ROVIRA (1971) qui, pour une terre rhizosphérique de blé, trouvent plus de Pseudomonas que dans la terre témoin, les proportions restant cependant faibles par rapport au nombre total de bactéries.

Au point de vue taxonomique, l'espèce la plus fréquemment citée est Ps. fluorescens : SOROKINA (1963) pour le maïs, SOBIESZCZANSKI (1965) pour le riz et la vesce, ULJASHOVA (1966) pour la tomate, SANDS et ROVIRA (1971) pour le blé ; et comme genre bactérien proche des Pseudomonas, ce sont les Flavobacterium qui sont fréquents : CHALVIGNAC (1965) , PETERSON et ROUATT (1967), RIVIERE et Coll. (1970).

Phénomène curieux : nos résultats font apparaître une diminution très nette des Bacillus dans la microflore rhizosphérique riche en Arthrobacter ; exactement comme dans le cas où les Pseudomonas sont dominants. RIVIERE et Coll. (1970) par exemple ne retrouvent que 8,2 % de Bacillus dans la rhizosphère du maïs alors que la terre témoin en contient 58,8 %. Même dans des sols très particuliers comme dans les zones désertiques, ELVAN et DIAB (1970) notent le même phénomène dans la rhizosphère de Artemisia monosperma.

Par contre, nos résultats, en particulier les cultures mixtes en présence d'extrait de terre ou d'exsudats racinaires, n'ont pas permis de vérifier l'antagonisme Pseudomonas-Arthrobacter, mis en évidence par CHAN et KATZ-NELSON (1961 et 1963) et par SIEBURTH (1967). Récemment SALONIUS et Coll. (1970) ont étudié la croissance mutuelle d'A. globiformis et Ps. fluorescens dans une terre stérilisée par irradiation gamma. Dans ces conditions ils constatent, à 25°C et à 60 % de saturation en eau de la terre, une croissance équivalente des deux bactéries, et identique à celle des cultures pures réalisées parallèlement. Par contre, à 10°C et à saturation, les Pseudomonas sont dominants, alors qu'à 40 % de saturation, ce sont au contraire les Arthrobacter qui prédominent.

Cette expérience confirme donc nos résultats, et infirme par conséquent aussi la théorie généralement admise, suivant laquelle les Pseudomonas sont plus nombreux dans la rhizosphère à cause de leur taux de croissance plus élevé et de leur temps de latence plus faible.

Ces considérations nous amènent à établir un parallélisme, sur le plan écologique, entre les Arthrobacter et les Pseudomonas d'origine rhizosphérique. En effet, nous avons déjà constaté que, dans les deux cas, leur présence s'établit au dépens des germes sporulés et qu'en culture pure, les uns comme

les autres ont des taux de croissance sensiblement équivalents, dans des conditions expérimentales proches des conditions naturelles.

De plus, quand ils sont d'origine rhizosphérique, ils n'ont pas d'exigences nutritionnelles très strictes, en particulier au point de vue vitaminique. Par contre, un pourcentage assez élevé de souches requiert la présence d'acides aminés et, de toutes façons, les souches prototrophes sont généralement très fortement stimulées en leur présence.

Leurs capacités métaboliques sont aussi très proches dans certaines conditions, et une expérience de KASZUBIAK (1965) illustre bien cette comparaison. En effet, ce chercheur, dont le but était de connaître, dans la rhizosphère du lupin, les microorganismes capables d'utiliser un alcaloïde - la spartéine - comme seule source d'azote et de carbone, met en évidence la présence de deux genres bactériens : les Pseudomonas et les Arthrobacter.

Enfin, les possibilités de synthèses, en particulier de vitamines et de substances de croissance végétales, sont identiques : nous avons démontré précédemment que les Arthrobacter rhizosphériques produisaient des vitamines, dont la vitamine B₁₂, et de l'acide β indolylacétique. D'autre part, on a aussi prouvé qu'ils étaient capables de synthétiser des substances de type gibbérellinique (KATZNELSON et SIROIS 1962). Or un travail récent de HUSSAIN et VAN CURA (1970) met simultanément en évidence la production, par des Pseudomonas rhizosphériques, de vitamines du groupe B (surtout la biotine et l'acide parathénique), l'acide β indolylacétique, et de substances gibbérelliniques. De nombreux facteurs sont donc communs aux Arthrobacter et aux Pseudomonas.

Pour terminer, précisons quelques caractéristiques propres aux Arthrobacter rhizosphériques, qui les distinguent des Arthrobacter d'origine différente. Pour cette analyse, signalons d'ailleurs que les revues bibliographiques très complètes de MULDER et Coll. (1963), MULDER (1964) et VELDKAMP (1970), nous ont été très utiles.

A partir des 121 souches d'Arthrobacter isolées à partir du Colza, notre étude systématique (Ann. Inst. Pasteur 1970 : publication précédente) permet finalement de proposer une classification basée sur l'utilisation de 3 critères :

les besoins nutritionnels, la présence d'une gélatinase et la possibilité de réduire les nitrates. Il est maintenant intéressant de comparer ces résultats avec ceux de SKYRING et QUADLING (1970) qui, à partir de 77 souches de germes corynéformes, ont appliqué une méthode numérique de classification basée sur l'utilisation de 98 tests dont les résultats sont analysés sur ordinateur. Cette étude leur a permis de sélectionner 5 critères de différenciation dont 2 : les besoins nutritionnels et la réduction des nitrates, correspondent à nos propres résultats. Les 3 autres sont : l'utilisation des composés carbonés, la production de catalase et la sensibilité aux antibiotiques. Nous pensons d'ailleurs que ces deux derniers critères ont été sélectionnés non pas pour différencier les Arthrobacter eux-mêmes mais les Arthrobacter par rapport aux espèces corynéformes proches, faisant partie de leur collection.

A propos des caractéristiques générales de nos souches, nous les avons déjà rapprochées des Arthrobacter isolés de limons souterrains par GOUNOT (1967). Par contre, nous avons remarqué que les Arthrobacter isolés des sols hollandais et nigériens par MULDER et Coll. (1966) avaient la particularité d'être exigeants en vitamines. Ce besoin en facteurs de croissance a été confirmé pour d'autres souches, d'origine tellurique : KEDDIE et Coll. (1966), MULLAKLANBKAI et BHAT (1966), ces derniers en ont d'ailleurs fait ensuite (1967) une étude taxonomique sur ordinateur. En plus de cette particularité sur le plan nutritionnel, qui distingue nos souches, on peut aussi noter l'absence de synthèse d'uréase alors que certains la mettent en évidence (par exemple MULLAKHANBKAI et Coll. 1966, GOUNOT 1967), et l'absence de mobilité, contrairement aux germes isolés par SPERBER et ROVIRA (1953). SKYRYNG et QUADLING (1969) précisent même que les souches mobiles possèdent un flagelle subpolaire.

En conclusion, nous soulignons le rôle important que peuvent jouer ces corynébactéries rhizosphériques dans la croissance des plantes et dans l'évolution des flores microbiennes. Nous pensons que leur étude doit être approfondie car ces germes se distinguent nettement des Arthrobacter typiquement telluriques.

3^e PARTIE

ETUDE PARTICULIERE

DE LA PRESENCE ET DU ROLE DE LA VITAMINE B₁₂

DANS LA RHIZOSPHERE DU COLZA

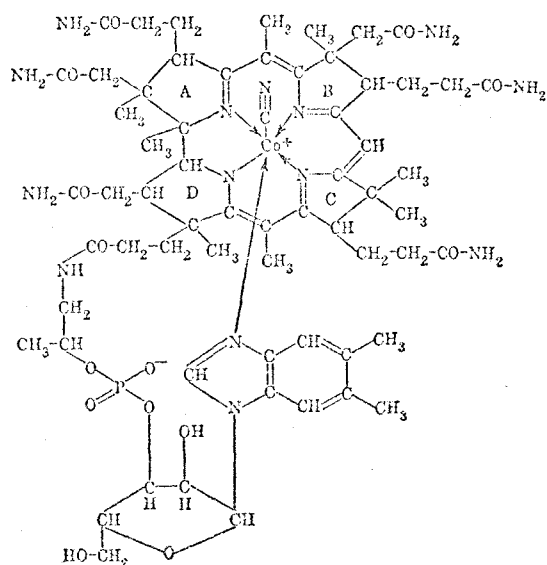
En comparant la concentration en vitamine B₁₂ des éluats de culture de Colza effectuées en conditions stériles ou en présence de microflores telluriques (page 51), nous avons remarqué une teneur toujours plus élevée lorsque les plantules se développent en présence de bactéries. Cependant, après avoir démontré que cette production vitaminique était bien un phénomène proprement rhizosphérique, nous avons insisté sur la relativité des résultats obtenus. En effet, la souche test choisie pour ce dosage : Lactobacillus leichmannii, qui est très couramment utilisée pour la détermination de la vitamine B₁₂, ne présente pas une spécificité stricte vis à vis de la cyanocobalamine ou même des cobamides en général. Aussi, nous avons particulièrement mis en doute la présence de ce facteur de croissance dans les éluats de cultures stériles de Colza puisque, jusqu'à présent, on a jamais pu mettre en évidence sa synthèse par les tissus végétaux.

Nous avons donc repris en détail l'étude de cet aspect particulièrement intéressant de la présence de vitamine B₁₂ dans la rhizosphère, en adoptant des techniques beaucoup plus précises dont certaines ont été mises au point spécialement en fonction des conditions d'analyse.

L. leichmannii, nous le savons, présente comme inconvénient majeur sa possibilité de répondre à des substances non vitaminiques : la thymidine et autres désoxyribosides. Une autre bactérie habituellement employée aussi : Escherichia coli 113/3 présente le même inconvénient car elle répond à la méthionine. Il nous restait donc, comme souches test disponibles, des algues : Euglena gracilis et Ochromonas malhamensis, très rarement utilisées à cause de leur difficulté d'entretien et de leur inhibition très rapide par les extraits à doser. Parmi celles-ci, O. malhamensis présente le plus grand degré de spécificité. Non seulement elle ne peut proliférer en présence de composés différents des cobamides, mais parmi les dérivés de ces cobamides sa spécificité est très grande. Afin de préciser cette spécificité, rappelons la formule de la vitamine B₁₂ (cyanocobalamine).

Schématiquement, c'est un noyau tétrapyrrolique dont les atomes d'azote sont unis par des liaisons de coordination à un atome central de cobalt. De plus, 2 valences de ce cobalt sont satisfaites par des liaisons avec un ion cyanure et avec un nucléotide dont la base est le diméthyl-benzimidazole. Cette cyanocobalamine est donc plus précisément la α -(5,6-diméthyl benzimi-

dazolyl)-cyano-cobamide. Quand l'ion cyanure est remplacé, dans la molécule, par un autre ion, on obtient d'autres cobalamine (ex : l'hydroxycobalamine ou vitamine B₁₂b, la nitrosocobalamine ou vitamine B₁₂c). Quand, dans le nucléotide, la base est différente, on obtient d'autres cobamides (facteurs A, B, etc...).



CYANOCOBALAMINE.

Le tableau suivant, qui met en évidence l'intérêt d'O. malhamensis pour l'obtention de dosages très spécifiques, a été établi à partir de résultats tirés des travaux de FORD (1953), que nous avons complétés en ajoutant des précisions d'ordre biochimique plus récentes.

Substances vitaminiques	Base du nucléotide dans la molécule	E. coli	L. leichmannii	E. gracilis	O. malhamensis
Cyanocobalamine	5,6-dimethylbenzimidazole	100	100	100	100
Facteur A	2 methyl adenine	100	64	137	3,4
Facteur B	Absence	100	<0,3	4,2	0
Facteur C	?	100	14	100	0
Pseudovitamine B ₁₂	Adenine	100	400	800	1,2

TABLEAU I.

Activité relative de différents composés de type B₁₂
mesurée à l'aide de plusieurs souches test .

(Les résultats sont exprimés par rapport à l'activité (=100) donnée par E. COLI).

C'est donc O. malhamensis, de préférence à E. gracilis que nous avons choisi pour nos analyses. Cette algue n'est cependant pas stimulée, d'une façon absolue, uniquement par les cobalamines : les analogues de la vitamine B₁₂, dont la base du nucléotide est le benzimidazole, le 5 methyl benzimidazole ou le 5 hydroxybenzimidazole (vitamine B₁₂ III ou facteur I) permettraient aussi sa croissance (ARONOVITCH et GROSSOWICZ 1968), ainsi que la forme coenzymatique isolée par BARKER et Coll. (1960), dont la base du nucléotide est constitué par un groupement adénine (WEISSBACH et Coll., 1960).

La conservation de cette algue a été effectuée en milieu liquide dans les ballons de 100 ml contenant 10 ml d'un milieu de culture (Bacto-B₁₂ Ochromonas medium Difco) supplémenté en vitamine B₁₂ à raison de 0,2 mpq/ml. Ces cultures sont placées dans une étuve régulée à 28°C sous la lumière d'une lampe à incandescence de 60 W, distante de 30 cm, et les repiquages sont effectués tous les 5 jours. Pour les dosages proprement dits, l'inoculum est prélevé à partir de ces cultures, quand elles sont âgées de 4 ou 5 jours. Si ces dosages demandent une grande précision, ils sont effectués dans des ballons de 100 ml contenant le milieu de base, et après incorporation des extraits et inoculation, ils sont placés en agitation continue (cycle rotatif à raison de 100 tours/mn), à 28°C et à l'obscurité, c'est à dire en conditions non photosynthétiques pour l'algue. Les dosages semi-quantitatifs par contre sont réalisés dans des tubes de 25 x 200 mm, incubés dans les mêmes conditions (pour la recherche des spots après chromatographie sur papier par exemple). La lecture des résultats se fait toujours par néphélométrie après 4 jours d'incubation.

Enfin, lorsqu'une extraction de la vitamine est nécessaire avant l'analyse, on incorpore toujours des traces de cyanure à la solution, pour convertir l'hydroxycobalamine éventuellement présente en cyanocobalamine, forme plus stable. Ce cyanure permet aussi l'obtention de résultats plus reproductibles.

A l'aide de ce dosage biologique, nous avons, dans un premier temps, mis en évidence d'une façon rigoureuse, la présence de vitamine B₁₂ dans la rhizosphère du Colza. Ensuite, dans un second temps, nous avons recherché le rôle que pouvait jouer ce facteur de croissance d'origine bactérienne, ce qui nous a conduit à étudier sa présence dans les tissus végétaux cultivés dans des conditions stériles ou pas.

A - MISE EN EVIDENCE DE LA PRODUCTION DE VITAMINE B₁₂ PAR LA MICROFLORE RHIZOSPHERIQUE DES PLANTULES DE COLZA.

Ce travail a été publié aux Comptes Rendus (1970, 270).

MICROBIOLOGIE DU SOL. — *Mise en évidence de la production de vitamine B₁₂ par la microflore rhizosphérique des plantules de Colza (Brassica napus oleifera).*
Note (*) de M. Roland Blondeau, présentée par M. Roger Heim.

Le substrat de germination des plantules de Colza cultivées en présence d'une microflore tellurique s'enrichit en cyanocobalamine. Celle-ci proviendrait essentiellement d'une synthèse propre aux bactéries rhizosphériques.

Lorsque des graines de Colza (variété Crésus) sont ensemencées en présence d'une microflore tellurique, le milieu de germination s'enrichit en diverses vitamines hydrosolubles (¹). La nature de celles-ci est souvent fonction des conditions expérimentales, en particulier de l'origine de la microflore apportée. Cependant, la concentration en vitamine B₁₂, considérée en tant que facteur de croissance pour *Lactobacillus leichmannii*, est toujours plus élevée dans les semis effectués en présence d'une flore microbienne (²). Les résultats que nous rapportons ici concernent l'étude de ce facteur de croissance, tant au point de vue de sa nature chimique que de son origine.

La technique de culture des graines, le mode de préparation des microflores telluriques et le système d'éluion des semis ont déjà été exposés (³). Précisons que, dans les expériences suivantes, les incorporations de microflore ne sont plus effectuées avant l'introduction des graines dans les tubes de culture, mais 3 jours après, lorsque les plantules ont déjà éliminé des substances organiques dans le substrat de germination. Tous les dosages vitaminiques sont réalisés à partir d'éluats de culture stérilisés par filtration sur membranes « Millipore » (0,45 μ), dont chaque millilitre correspond à la germination de 5 graines de Colza.

I. DOSAGE DE LA VITAMINE B₁₂ PRÉSENTE DANS LES ÉLUATS DE GERMINATIONS EFFECTUÉES EN CONDITIONS STÉRILES OU EN PRÉSENCE DE MICROFLORE TELLURIQUE. — Ce dosage a été entrepris à l'aide des techniques microbiologiques. Les résultats sont donnés après lecture néphélométrique. Les souches utilisées sont, d'une part, *Lactobacillus leichmannii* ATCC 7830, *L. leichmannii* ATCC 4797, et, d'autre part, *Ochromonas malhamensis* ATCC 11532 selon la méthode de Ford (⁴).

Les résultats sont consignés dans le tableau I. Les semis MT sont réalisés en présence d'une microflore, les semis stériles (ST), considérés comme témoins, ont reçu le même apport de suspension dilution de terre, mais après autoclavage de celle-ci. Un dosage préliminaire a montré que l'apport de vitamine, provoqué par l'introduction de cette suspension de terre, pouvait être considéré comme négligeable.

Ces résultats précisent les dosages précédemment effectués avec *L. leichmannii* ATCC 7830 (²), mais l'utilisation d'*O. malhamensis*, qui ne répond qu'à la cyanocobalamine, ou à l'hydroxycobalamine (⁵), à l'exclusion de tout autre analogue des cobalamides ou de facteur non vitaminique [(⁶), (⁷), (⁸)], en confirmant la présence de cyanocobalamine dans les semis MT donne cependant des valeurs

(2)

TABLEAU I

Concentration en vitamine B₁₂ des éluats de culture de plantules
de Colza (en µg/plantule)

Age des plantules		<i>L. leichmannii</i> ATCC 7830	<i>L. leichmannii</i> ATCC 4797	<i>O. malhamensis</i> ATCC 11532
5 jours	ST	0,001 8	0,001 8	< 0,001 5
	MT	0,002 3	0,002 1	≤ 0,001 5
8 jours	ST	0,003 2	0,003 5	< 0,001 5
	MT	0,010 3	0,010 8	0,008 2
11 jours	ST	0,005 4	0,005 8	< 0,001 5
	MT	0,013 4	0,013 7	0,010 7
14 jours	ST	0,005 6	0,005 8	< 0,001 5
	MT	0,013 0	0,013 2	0,011 0

très différentes, dans le cas des semis stériles. Soulignons pourtant que la limite de sensibilité de cette souche, dans nos conditions expérimentales, ne permet pas de détecter une concentration de cyanocobalamine inférieure à 1,5 µg par plantule, un facteur inhibiteur interférant dans les cultures de cette algue lorsqu'elles contiennent un volume trop important d'éluat.

II. CARACTÉRISATION DE CETTE VITAMINE. — Afin de vérifier l'absence de formes conjuguées de vitamine B₁₂ dans les échantillons collectés, nous avons d'abord effectué des hydrolyses enzymatiques avec la papaine (BBL) ou la taka-diastase (T et M). Malgré la difficulté de l'appréciation des résultats obtenus, due à l'apport, par les préparations enzymatiques, de substances stimulantes pour *L. leichmannii*, il ne semble pas que de telles formes vitaminiques, moins actives dans les dosages biologiques, soient présentes dans les éluats.

Dans nos conditions expérimentales, les techniques classiques de purification de la vitamine B₁₂ par adsorption (charbon Norit) donnant un rendement relativement faible, nous avons finalement utilisé la filtration sur gel : les éluats correspondant aux germinations de 900 plantules sont déposés, après concentration, sur colonne de « Sephadex G 25 » (2,5 × 50 cm) éluee par de l'eau distillée contenant du KCN (1 ml/l d'une solution à 5 %) à un rythme de 30 ml/h. Les fractions collectées (5 ml) contenant la vitamine B₁₂, repérables par dosage d'une partie aliquote avec *L. leichmannii*, sont ensuite lyophilisées.

Des chromatographies sur papier sont enfin préparées à partir de ces lyophilisats en prenant comme témoin la cyanocobalamine (NBC). Sur papier « Whatman n° 1 », à l'obscurité et à 27 °C, après révélation avec *L. leichmannii*, nous avons pu ainsi vérifier que le facteur vitaminique mis en évidence dans les cultures réalisées en présence de microflore tellurique avait des R_f correspondant à la cyanocobalamine : 0,31 avec le système Butanol sec./eau (2/1 v/v) + traces de KCN ; 0,74 avec le système Isopropanol/eau (7/3 v/v) + traces de KCN. Par contre, à partir des éluats de cultures stériles, aucune trace de vitamine ne peut être localisée sur les chromatogrammes, probablement à cause de la trop faible concentration initiale.

(3)

III. SYNTHÈSE DE VITAMINE B₁₂ PAR DES CULTURES DE SOUCHES BACTÉRIENNES D'ORIGINE TELLURIQUE ET RHIZOSPHÉRIQUE. — La présence de cette cyanocobalamine étant fonction de l'établissement de la microflore rhizosphérique dans les cultures des plantules, nous avons comparé la capacité de production de cette vitamine par les flores tellurique et rhizosphérique; cette dernière est obtenue après 6 jours de culture des plantules en présence de la flore tellurique. Après étalement de ces flores sur milieu gélosé de Bunt et Rovira (⁹), les souches bactériennes isolées sont incubées pendant 48 h, à 28 °C, dans un milieu liquide dépourvu de vitamine B₁₂ (¹⁰). Celle-ci est décelée avec *L. leichmannii* dans les surnageants, après centrifugation des cultures. Les résultats (tableau II) montrent que non seulement le nombre de germes producteurs de vitamine B₁₂ est plus important dans la flore rhizosphérique, mais aussi que leur capacité de synthèse est plus élevée.

TABLEAU II

Production de vitamine B₁₂ par une flore tellurique et la flore rhizosphérique correspondante en présence de culture de Colza

	Nombre de souches isolées	Souches productrices de vitamine B ₁₂	
		B ₁₂ > 0,01 mg/ml (*)	B ₁₂ > 0,1 mg/ml
Flore tellurique	100	31	3
Flore rhizosphérique	100	63	17

(*) Les concentrations inférieures ne sont pas significatives.

IV. PRODUCTION DE VITAMINE B₁₂ PAR DES BACTÉRIES RHIZOSPHÉRIQUES INOCULÉES A DES CULTURES STÉRILES DE COLZA. — Afin de démontrer que ces souches bactériennes, d'origine rhizosphérique, étaient effectivement capables de synthétiser de la cyanocobalamine en présence des seules substances organiques libérées par le système racinaire des plantules, nous les avons inoculées à des cultures stériles de Colza. Après incubation, à 28 °C en milieu agité, les souches choisies sont prélevées en phase exponentielle de croissance, centrifugées, lavées, et diluées de façon à ce que 1 ml corresponde à environ 10⁶ germes.

L'inoculation des bactéries est toujours effectuée dans des cultures de Colza âgées de 3 jours et chaque tube d'essai reçoit 0,5 ml de suspension bactérienne.

TABLEAU III

Teneur en cyanocobalamine des éluats de culture de plantules de Colza, effectuée en présence de bactéries d'origine rhizosphérique (en mg/plantule)

Souches inoculées	Age des plantules		
	6 jours	9 jours	12 jours
C 24	0,007 8	0,019 2	0,021 8
C 90	0,006 2	0,018 0	0,016 7

(4)

Les tubes témoins reçoivent le même inoculum, mais après autoclavage. Dans le tableau III, seuls sont présentés les résultats du dosage de la cyanocobalamine, effectué avec *O. malhamensis*, à partir de cultures réalisées en présence de 2 bactéries d'origine rhizosphérique, C₂₄ et C₉₀, du genre *Arthrobacter*. Les cultures stériles témoins donnent toujours des résultats non significatifs.

CONCLUSION. — Lors du développement des plantules de Colza en présence d'une microflore tellurique, le système racinaire élimine des substances organiques permettant l'établissement d'une flore dite « rhizosphérique », responsable de la production de cyanocobalamine qui s'accumule dans le substrat. Ce phénomène peut aussi être obtenu après inoculation de souches pures à des cultures de Colza. Le problème que pose le devenir de cette vitamine est à l'étude. Deux hypothèses sont à envisager : ou cette substance agit directement sur la plante, ou elle intervient dans la prolifération de germes telluriques exigeant en ce facteur de croissance.

(*) Séance du 1^{er} avril 1970.

- (1) R. BLONDEAU, *Comptes rendus*, 266, Série D, 1968, p. 2017.
- (2) R. BLONDEAU, *Ann. Inst. Pasteur*, Lille, 20, 1969, p. 255.
- (3) R. BLONDEAU, *Bull. Soc. Bot. Nord Fr.*, 21, 1968, p. 99.
- (4) J. E. FORD, *Brit. J. Nutr.*, 7, 1953, p. 299.
- (5) T. KATO et S. SHIMIZU, *J. Vitaminol. Jap.*, 9, 1963, p. 32.
- (6) H. N. CONG et R. VALENCIA, *Bull. Soc. Chim. Biol. Fr.*, 46, 1964, p. 751.
- (7) W. H. C. SHAW et C. J. BESSEL, *The Analyst*, 85, 1960, p. 389.
- (8) H. R. SKEGGS, *Methods biochem. Anal. USA*, 14, 1966, p. 53.
- (9) J. S. BUNT et A. D. ROVIRA, *J. Soil Sc.*, 6, 1955, p. 119.
- (10) A. G. LOCHHEAD et F. E. CHASE, *Soil. Sc.*, 55, 1943, p. 185.

(Laboratoire de Cryptogamie, Faculté des Sciences,
B. P. n° 36, 59-Lille, Nord.)

Les résultats des analyses que nous venons de présenter nous amènent donc à nous poser une question : la vitamine B₁₂, synthétisée par la microflore rhizosphérique peut-elle jouer un rôle, soit dans la croissance des plantes, soit dans la multiplication des germes telluriques particuliers. Etant donné l'importance que pourrait jouer ce facteur de croissance, sur le plan biochimique, dans le métabolisme des tissus végétaux qui, en principe, sont incapables de le synthétiser, nous avons voulu approfondir cet aspect du problème en recherchant si cette B₁₂ était bien emmagasinée dans les tissus végétaux.

Avant d'aborder cette étude, des travaux effectués par PFAU et Coll. (1962) avaient démontré que la B₁₂ radioactive marquée au cobalt 60 pouvait être absorbée par les racines des végétaux et être transportée jusqu'aux feuilles. Le but de leurs recherches était cependant différent du notre, et les plantes se développaient en conditions non stériles. Nous avons donc personnellement essayé de mettre en évidence, avec des plantules de Colza, l'absorption de B₁₂ par le système racinaire, en y ajoutant, si possible, des données quantitatives.

Cette expérience a été menée en utilisant la vitamine B₁₂ radioactive marquée au ⁵⁸Cobalt (C.E.A.), conditionnée en ampoules lyophilisées et présentant une activité spécifique de 1 μ Ci/ μ g de B₁₂. Les cultures de Colza ont été effectuées, soit dans des tubes simples contenant du sable de Fontainebleau comme substrat de germination, soit dans des tubes comportant des ergots internes pour supporter les graines en milieu hydroponique. Pour chaque expérience, on utilise 30 tubes simples ensemencés stérilement à raison de 25 graines par tube, ou 75 tubes en culture hydroponique, contenant 10 graines par tube. Suivant le cas, l'incorporation de la B₁₂ se fait soit après 3 jours de germination, c'est à dire lorsque les plantules comportent une partie aérienne suffisamment développée pour qu'il n'y ait aucun contact avec la B₁₂ radioactive incorporée dans le milieu de culture, soit après 10 jours de germination. Dans chaque cas, on laisse croître les plantules en présence de B₁₂ pendant 10 jours avant de procéder à la récolte des parties foliaires. Pour les cultures sur sable, on incorpore 1 ml d'une solution contenant 0,05 μ g de B₁₂ par tube (environ 0,05 μ g Ci), et pour les cultures hydroponiques 1 ml d'une solution contenant 0,02 μ g (environ 0,02 μ g Ci). Ainsi, quelque soit le type de culture, chaque plantule dispose en quelque sorte de 0,002 μ g de B₁₂.

La récolte de la partie foliaire des plantules s'effectue avec précaution de façon à éviter leur contamination avec la B₁₂ du milieu de culture. Elles sont pesées, lavées à l'eau distillée puis broyées à l'aide d'un "Ultra Turrax" et l'extraction de la vitamine se poursuit par 2 autoclavages successifs (0,5atm

pendant 15 mn). Après chacun d'eux, l'extrait est filtré et les filtrats obtenus sont rassemblés, délipidés, congelés, puis filtrés à nouveau et concentrés de façon à être incorporés dans le scintillateur de KENNEDY. La mesure de la radioactivité se fait à l'aide d'un compteur à scintillation de type INTER-TECHNIQUE (ABAC SL 40). Les résultats, rassemblés dans le tableau suivant, sont exprimés en μg de $\text{B}_{12}^{58}\text{Co}$ présent dans les extraits. La conversion de la radioactivité des tissus en μg de vitamine B_{12} a été effectuée par comparaison à un échantillon radioactif conservé pendant la même durée et corrigé en fonction des conditions de scintillation.

Type de culture	Mode de calcul	Période d'incorporation de la $\text{B}_{12}^{58}\text{C}$	
		3 - 13 jours	10 - 20 jours
sur sable	- pour 100 plantules	0,498	0,790
	- pour 1 g(poids frais)	0,128	0,154
en milieu liquide.	- pour 100 plantules	1,150	3,361
	- pour 1 g(poids frais)	0,183	0,375

TABLEAU I.

Incorporation de vitamine $\text{B}_{12}^{58}\text{Co}$ par des plantules de Colza cultivées sur sable ou en milieu hydroponique.

(Les résultats sont exprimés en μg de $\text{B}_{12}^{58}\text{Co}$ présente dans les tissus).

De ces résultats, il ressort les conclusions suivantes :

a - La vitamine B_{12} présente dans le substrat de germination des plantules est bien absorbée par leur système racinaire. Les concentrations trouvées dans les tissus sont faibles, mais d'autres expériences que nous avons effectuées par la suite confirment la reproductibilité des résultats.

b - Quand les plantules sont plus âgées, l'incorporation de vitamine est plus importante, surtout en milieu hydroponique.

c - L'incorporation est aussi plus élevée dans le cas des cultures se développant sur milieu liquide que sur sable. En considérant les teneurs vitaminiques ramenées par g. de poids frais, cette différence est cependant moins nette.

Si la vitamine B_{12} peut être absorbée par le système racinaire des plantes, nous devrions ainsi en trouver dans les tissus des végétaux cultivés dans des conditions non stériles puisque les microflores rhizosphériques en synthétisent.

B - LA TENEUR EN VITAMINE B_{12} DES VÉGÉTAUX SUPÉRIEURS.

Le résultat de ces analyses a été publié (Comptes Rendus 1971, 272).

BIOLOGIE VÉGÉTALE. — *La vitamine B₁₂ des végétaux supérieurs*. Note (*)
de M. Roland Blondeau, présentée par M. Roger Heim.

Par dosage microbiologique avec *Ochromonas malhamensis*, on peut mettre en évidence la présence de cyanocobalamine dans les tissus végétaux sains. L'origine et le rôle de cette vitamine sont discutés.

Lorsque des plantules de colza sont cultivées sous certaines conditions, en présence d'une microflore d'origine tellurique ⁽¹⁾, le substrat de culture s'enrichit en vitamine B₁₂. Nous avons prouvé d'ailleurs ⁽²⁾ que cette cyanocobalamine est un produit de synthèse bactérienne, et en particulier de germes du genre *Arthrobacter*, fréquents dans la rhizosphère du colza. De plus, en incorporant de la cyanocobalamine radioactive au milieu de culture de germinations, nous savons qu'il est possible de la détecter dans la partie aérienne des plantules ⁽³⁾. Comme il est généralement admis que la cellule végétale est incapable de synthétiser ce facteur de croissance, nous nous sommes proposés d'en rechercher sa présence dans des tissus ou organes provenant de végétaux cultivés dans des conditions non stériles.

MATÉRIEL. — Les organes végétaux utilisés pour les dosages sont des graines : colza et pois ; des tiges : orge et pomme de terre ; ou des racines : carotte. Tous sont prélevés à partir de cultures effectuées en champs. Nous avons aussi effectué des extractions à partir des parties aériennes de plantules de colza cultivées en milieu hydroponique stérile, ou inoculé par un *Arthrobacter* d'origine rhizosphérique (souche C₂₄). Dans les deux cas, la solution nutritive est du Knop dilué au demi, contenant en plus des traces de CoCl₂.

Pour mettre au point nos méthodes de dosages et afin de contrôler leur spécificité, deux autres échantillons furent utilisés. Le premier, que nous considérons comme « témoin positif », devait contenir de la cyanocobalamine : nous avons choisi des racines de trèfle pourvues de nodosités. Leurs extraits sont en effet relativement riches en B₁₂, synthétisée par les *rhizobium* [⁽⁴⁾, ⁽⁵⁾]. Le second, notre « témoin négatif », devait être totalement déficient en cyanocobalamine : nous avons choisi des cultures *in vitro* stériles, d'une souche chlorophyllienne de carotte ⁽¹⁷⁾. Les extractions à partir de ce tissu ont toujours été effectuées après un minimum de trois repiquages de la souche sur un milieu nutritif dépourvu de cobalt et solidifié (Bacto-Agar Purified, Difco).

MÉTHODES. — La cyanocobalamine est dosée à partir des extraits végétaux avec *Ochromonas malhamensis* ATTC 11532, qui présente une spécificité plus stricte que *Lactobacillus leichmannii* [⁽⁶⁾, ⁽⁷⁾, ⁽⁸⁾]. L'utilisation de cette souche présente cependant un inconvénient, car sa croissance est très rapidement inhibée en présence des extraits d'origine végétale. Une technique de purification des extraits a dû ainsi être mise au point.

(2)

Extraction de la vitamine. — Elle s'effectue, après broyage des tissus à l'aide d'un « ultra turrax » en présence d'eau bidistillée contenant 10 mg/litre de KCN, par autoclavage à 110 °C pendant 15 mn. Après filtration, la solution obtenue est concentrée si nécessaire, puis conservée au congélateur. Nous avons éliminé toute extraction enzymatique par la papaïne ou la takadiastase, celles-ci donnant des « blancs » beaucoup trop élevés dans les dosages.

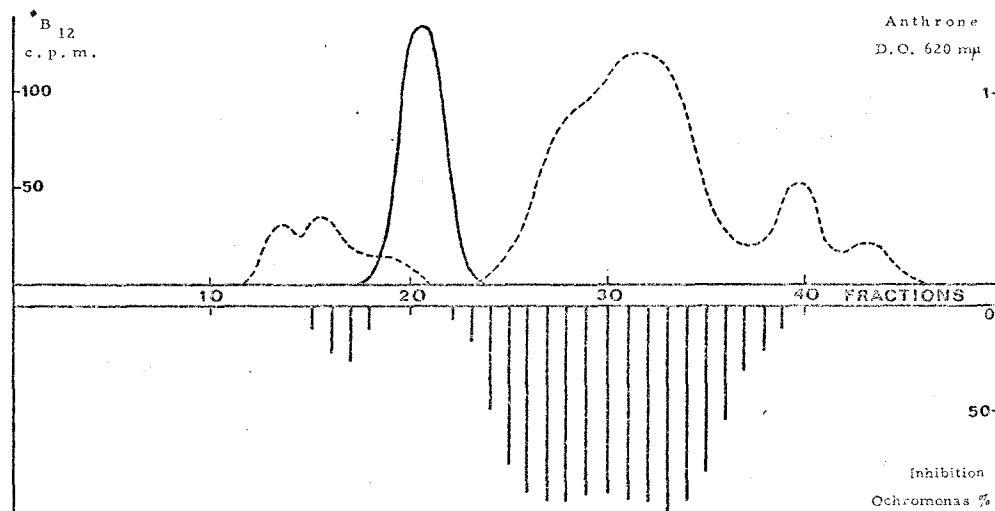
Purification des extraits. — Deux techniques différentes s'effectuant à l'abri de la lumière ont été mises au point grâce à l'utilisation de cyanocobalamine radioactive ^{58}Co (CEA) :

1^{re} technique : on dépose l'échantillon sur une résine « Dowex 50 W X 2 » (Fluka) traitée suivant une méthode déjà décrite (9), et équilibrée dans un tampon formiate d'ammonium 0,01 M à pH 3,0. L'élution de cette résine par ce même tampon formiate donne une solution effluente contenant la cyanocobalamine. Cette solution, après concentration sous vide, est ensuite chromatographiée sur CM « Sephadex C 25 », élué par un tampon phosphate M/45 à pH 6,25, contenant des traces de KCN.

La figure montre que cette méthode permet la séparation de la cyanocobalamine ^{58}Co incorporée à l'extrait végétal avant chromatographie, des substances inhibant la croissance d'*O. malhamensis*. La courbe d'inhibition semble d'ailleurs correspondre à la teneur en sucres des fractions collectées, révélables par l'anthrone.

Les fractions contenant la B_{12} sont récupérées, concentrées à un volume tel que 1 ml corresponde à 1 g d'extrait végétal frais, stérilisées par filtration (Millipore 0,45 μ), et conservées à l'obscurité, au congélateur.

2^e technique : elle comporte uniquement l'utilisation d'une résine Amberlite IRC-50 (Prolabo), employée sous forme H^+ (obtenue avec HCl 2 N suivi d'un lavage à l'eau bidistillée). Après passage des extraits, la cyanocobalamine, retenue sur la résine, est éluée avec une solution N de NH_4OH . L'éluat, concentré à sec, est repris par un volume d'eau bidistillée + KCN tel que 1 ml corresponde à 1 g d'extrait, puis stérilisé sur filtre, et conservé comme précédemment.



Chromatographie sur CM « Sephadex C 25 » d'un extrait végétal préalablement traité sur « Dowex 50 W X 2 » (15 g de carottes) et d'une solution de cyanocobalamine ^{58}Co .

Colonne : 2,5 × 40 cm ; éluant : tampon phosphate M/45 pH 6,25 + KCN ; fractions : 5 ml ; rythme d'élution : 55 ml/h.

Trait plein : Cyanocobalamine : radioactivité déterminée en scintillation à partir de 1 ml de chaque fraction avec le scintillateur de Kennedy (11).

Trait discontinu : Extrait végétal : D. O. obtenue à 620 m μ après réaction de 1 ml de chaque fraction avec l'anthrone.

Barres verticales : Extrait végétal : inhibition d'*Ochromonas* provoquée par chaque fraction (4 ml). Les résultats sont exprimés par la différence entre la croissance du témoin sans éluat (= 100) et la croissance obtenue en présence des éluats collectés. La lecture se fait en néphélométrie ; le milieu de culture (Bacto B_{12} *Ochromonas* medium Difco) contient 0,1 mg de vitamine B_{12} /ml.

(3)

Enfin, l'incorporation de quantités connues de cyanocobalamine ^{58}Co ou de vitamine B_{12} cristallisée, à des extraits végétaux purifiés suivant la 1^{re} méthode nous a donné un rendement de l'ordre de 70 à 75 %, alors qu'il est de 95 à 100 % en employant la seconde méthode.

Dosage proprement dit. — Il est effectué suivant la méthode de Ford (10). La gamme étalon du dosage est préparée avec de la cyanocobalamine pure (NBC). La gamme expérimentale comporte des volumes compris entre 0,25 et 2 ml des extraits à doser. La lecture des résultats se fait par néphélométrie.

RÉSULTATS. — Les teneurs en vitamine B_{12} des différents extraits analysés sont rassemblées dans le tableau. En utilisant la technique de purification impliquant un passage des solutions sur CM « Sphadex », les concentrations finalement obtenues sont plus faibles, mais ces résultats ne sont que relatifs puisqu'il faut les corriger en fonction du rendement relativement peu élevé caractérisant cette méthode. D'autre part, la Dowex utilisée retenant certaines cobalamines (9), cette méthode de purification est plus spécifique vis-à-vis de la cyanocobalamine que la seconde, ce qui peut aussi expliquer ces différences. Par contre, nous constatons que les plantes provenant de cultures non stériles contiennent toujours plus de vitamine B_{12} que celles qui ont été cultivées stérilement. Ainsi, la tige feuillée de colza donne une concentration 4 à 5 fois plus élevée lorsque la germination a lieu en présence d'une bactérie.

TABLEAU

Répartition de la vitamine B_{12} dans quelques organes végétaux provenant de cultures stériles ou non stériles (en $\mu\text{g/g}$ de poids frais), selon deux techniques de purification

	1 ^{re} technique	2 ^e technique
Racines de trèfle	5,100	6,800
Souche chlorophyllienne de carotte.....	< 0,020	< 0,020
Graines de pois	0,030	0,046
Graines de colza	(1)	(1)
Plantules stériles de colza	0,022	0,035
Plantules de colza + C_{24}	0,110	0,128
Tiges feuillées d'orge	0,076	0,091
Tiges feuillées de pommes de terre	0,114	0,138
Racines de carottes.....	0,065	0,080

(1) Le dosage n'est pas possible car un inhibiteur persiste après purification.

DISCUSSION. — Ces teneurs en B_{12} des tissus sains provenant de cultures non stériles, qui sont de l'ordre de 0,1 $\mu\text{g/g}$ de poids frais, sont relativement faibles par rapport aux résultats déjà signalés^(11,12,14,15). Nous pensons que souvent cette différence est due au choix de la souche test utilisée pour le dosage : avec *L. leichmannii*, la précision des résultats est en effet assez aléatoire étant donné l'interférence des désoxyribosides, difficile à éliminer ou à soustraire.

Quant à la présence apparente de cyanocobalamine dans le colza cultivé stérilement, elle ne peut être interprétée comme un apport de la graine puisque les graines, même de légumineuses telles que le pois, ne contiennent pas de concentrations excessives de B_{12} (tableau) et celle-ci, au cours de la germination, ne peut que se diluer dans les tissus de la plantule. Deux possibilités restent donc à envisager : *O. malhamensis* répond à d'autres composés que les cobalamines, ou alors, les végétaux sont capables de synthétiser de très faibles quantités de cobalamines, comme le pensent certains chercheurs (16). La présence d'un artefact doit être éliminé puisque par chromatographie de lyophilisats d'extraits purifiés de colza, développées avec le

(4)

système butanol sec./eau (2/1 v/v) + KCN et le système isopropanol/eau (7/1 v/v) + KCN, sur papier Whatman n° 1 à l'obscurité, on obtient après révélation avec *O. malhamensis*, une tache dont le R_f correspond à la cyanocobalamine traitée dans les mêmes conditions.

CONCLUSION. — Nous avons démontré que la vitamine B₁₂, synthétisée par la microflore rhizosphérique des plantes, ou plus généralement par la microflore tellurique, se retrouve partiellement, dans les tissus végétaux. Cependant, leur teneur en est relativement faible, et à notre connaissance, aucune expérience ne permet à ce jour d'affirmer son rôle dans le métabolisme normal des plantes. Aussi, nous pensons que cette cyanocobalamine d'origine bactérienne intervient, soit à l'état libre, dans le sol, soit dans les tissus des végétaux morts, comme facteur de croissance nécessaire à la prolifération de germes à pouvoir de synthèse faible. La présence de ces germes est indispensable, en particulier lors de la dégradation de certains constituants cellulaires.

(*) Séance du 3 mai 1971.

- (1) R. BLONDEAU, *Comptes rendus*, 270, Série D, 1970, p. 2040.
- (2) R. BLONDEAU, *Ann. Inst. Pasteur*, Lille, 21, 1970, p. 295.
- (3) A. PFAU, G. KALLISTRATOS et B. OSSOWSKI, *Atompraxis*, 8, 1962, p. 392.
- (4) J. DUDA, Z. PEDZIWIŁK et K. ZODROW, *Acta microbiol. Polonica*, 6, 1957, p. 233.
- (5) M. KLIEWER et H. J. EVANS, *Nature*, 194, 1962, p. 108.
- (6) W. H. C. SHAW et C. J. BESSEL, *The analyst*, 85, 1960, p. 389.
- (7) HAN NGUYEN CONG et R. VALENCIA, *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 46, 1964, p. 751.
- (8) H. R. SKEGGS, *Methods Biochem. Anal.*, 14, 1966, p. 53.
- (9) R. SCANDURRA, G. BARBONI et V. POLITI, *Acta Vitaminol. et enzymol.*, 23, 1969, p. 92.
- (10) J. E. FORD, *Brit. J. Nutr.*, 7, 1953, p. 299.
- (11) J. F. KENNEDY, *Experientia*, 25, 1969, p. 1120.
- (12) E. M. BICKOFF, A. L. LIVINGSTON et N. S. SNELL, *Arch. Biochem.*, 28, 1950, p. 242.
- (13) H. T. PEELER, H. YACOWITZ, C. W. CARLSON, R. F. MILLER, L. C. NORRIS et G. F. HEUSER, *Jour. Nutrition*, 43, 1951, p. 49.
- (14) K. ROHATGI, M. BANERJEE et S. BANERJEE, *J. Nutrition*, 56, 1955, p. 403.
- (15) L. F. GRAY et L. D. DANIEL, *J. of Nutrition*, 67, 1959, p. 623.
- (16) L. FRIES, *Physiol. Plant.*, 15, 1962, p. 566.
- (17) M. Dubois du Laboratoire de Physiologie végétale nous a fourni cette souche.

*Université des Sciences et Techniques,
Laboratoire de Cryptogamie et Centre de Recherches sur la Cellule,
B. P. n° 36, 59-Villeneuve d'Ascq, Nord.*

C - DISCUSSION SUR LA PRESENCE DE LA VITAMINE B₁₂ DANS LES TISSUS VEGETAUX.

Nous venons de démontrer que les tissus végétaux sains contiennent de la vitamine B₁₂. Nous avons interprété ce résultat, mais contrairement à notre attente, les plantules cultivées stérilement ont permis aussi, quoique très modérément, la croissance d'O. malhamensis. Nous allons donc reprendre les données de ce problème en étudiant successivement le cas des plantes provenant de cultures non stériles, puis le cas des plantes cultivées stérilement pour lesquelles nous avons effectué des expériences complémentaires.

1° Cas des tissus végétaux provenant de cultures non stériles.

Nos résultats concernant la teneur en B₁₂ de ces tissus sont inférieurs à ceux que nous donne la littérature. Nous pensons qu'il est pourtant très facile d'expliquer ces différences car les travaux relatifs à ces recherches n'étant pas très récents, les auteurs n'ont pas toujours utilisé des méthodes de dosage suffisamment strictes. D'autre part, ces recherches sont aussi très souvent effectuées à partir de légumineuses, et dans ce cas, la B₁₂ peut provenir d'une synthèse propre aux Rhizobium, même lorsque les plantes se développent en absence de ces bactéries car les graines peuvent elles-mêmes synthétiser cette vitamine.

Ainsi BICKOFF et coll. (1950) trouvent des concentrations très élevées 50 à 62 µg/g de poids frais pour la luzerne, avec L. leichmanii, mais signalent déjà que 85 % au moins de cette teneur vitaminique est due à la présence de désoxyribosides. ROHATGI et coll. (1955), pour diverses légumineuses, notent 4 à 6 µg/g, mais utilisent aussi L. leichmanii sans effectuer de corrections. Enfin PORTER (1957), avec O. malhamensis, trouve 2,3 µg/g pour la farine d'arachide, et précise en outre qu'en plus de la cyanocobalamine, les facteurs A et B sont présents (et détectés avec E. Coli).

Nous pensons donc que nous ne pouvons comparer ces résultats aux nôtres, étant donné la famille végétale choisie par ces auteurs. De même ceux de PEELER et coll. (1951) se rapportant en particulier au blé et à l'avoine ne

sont pas très significatifs car le dosage est effectué avec L. leichmanii après extraction enzymatique à la papaine et à la takadiastase, et nous savons que ce type d'extraction provoque des erreurs dans les dosages. Par contre les résultats de GRAY et DANIEL (1959) provenant d'analyses effectuées avec O. malhamensis à partir de feuilles de navet nous intéressent plus particulièrement : ils notent une concentration de 7 $\mu\text{g/g}$ de vitamine B_{12} , ce qui est donc très supérieur à celle que nous avons obtenu en moyenne à partir de notre matériel. Cependant, ces auteurs utilisent les feuilles de navet car certaines observations les avaient conduits à choisir ce matériel, supposé riche en B_{12} . Il est en effet possible que les feuilles en contiennent plus car si nous reprenons nos propres résultats, nous nous rendons compte que le matériel qui s'est révélé être le plus riche est aussi celui qui présentait une surface foliaire bien développée : la tige feuillée de pomme de terre. Ainsi, une étude de la teneur en vitamine B_{12} des plantes en fonction de leur différents organes nous donnerait peut être des résultats intéressants.

2° Cas des tissus végétaux provenant de cultures stériles.

Nous avons déjà souligné l'anomalie posée par le résultat obtenu avec les plantules de Colza (page 118) puisque ces tissus donnent une réponse positive avec O. malhamensis. Il est peu probable que la substance de croissance intervenant ait pour origine la graine puisque des extractions effectuées à partir de très jeunes plantules, ou à partir de plantules âgées donnent des concentrations voisines (exprimées par g. de poids frais), ce qui ne serait pas le cas si une substance, présente dans la graine, diffusait dans les tissus au cours de la germination. A partir de la souche chlorophyllienne de carotte, nous avons aussi constaté une réponse avec O. malhamensis mais celle-ci restait assez faible avec les volumes d'extraits utilisés, et ne pouvant contrôler la proportionnalité des résultats, nous n'avons pu leur donner une valeur significative. Ceux-ci nous semblaient d'ailleurs d'autant plus aberrants que le milieu de culture ne contenait pas de cobalt. (Notons cependant que ce milieu était solidifié avec de la gélose).

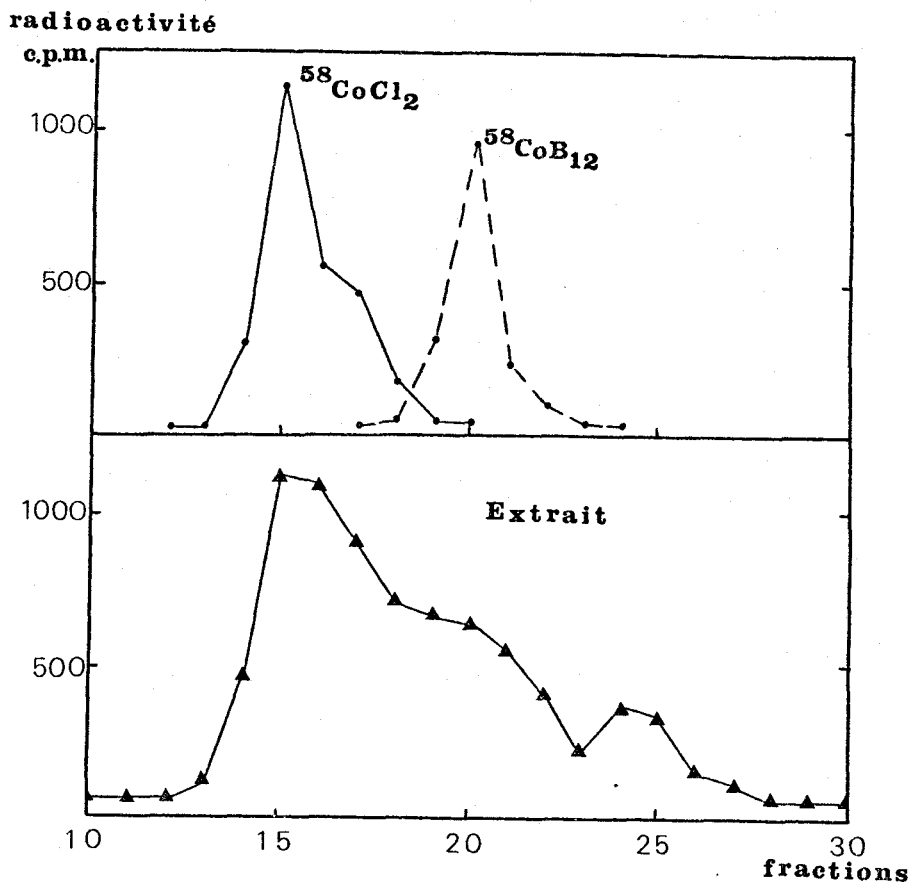
Etant donné certains résultats positifs, obtenus en particulier par FRIES (1962) à partir de plantules de pois ou de blé cultivées stérilement et dont les extraits sont dosés avec E. Coli 113/3; et certaines remarques émises par VALENCIA (1965) à propos de la présence éventuelle d'analogues de cobalamines chez les végétaux; nous nous sommes intéressés à ce problème posé par la synthèse possible de cobalamines par les végétaux. Dans une première optique expérimentale, nous avons essayé d'aborder le problème en incorporant du cobalt radioactif au milieu de culture de plantules de Colza cultivées stérilement; dans une seconde, nous avons modifié les conditions de culture et d'analyse des tissus stériles de carottes vertes afin d'obtenir des résultats plus significatifs.

a) Expérimentation basée sur l'utilisation de $^{58}\text{CoCl}_2$:

Le but de ce travail était d'incorporer du cobalt marqué au milieu de culture de graines de Colza, et d'effectuer après germination de celles-ci, une extraction de vitamine B_{12} suivie d'un comptage en scintillation de la radioactivité. Si les tissus sont capables de synthétiser cette vitamine, on devrait obtenir une radioactivité après purification sélective des extraits.

Nous avons choisi comme marqueur le cobalt 58 livré par le C. E. A. sous forme de chlorure en solution dans HCl (activité spécifique voisine de 2 Ci/mg). Ce radio élément est incorporé à la solution nutritive de KNOP à raison de $\mu\text{Ci/ml}$ et les graines sont ensemencées en culture hydroponique dans des tubes à ergots ou dans les erlens à cultures (page 20). Après 20 jours les plantules sont broyées et la vitamine B_{12} est extraite suivant la technique précédemment décrite (page 117). Après passage sur résine DOWEX 50 W x 2, l'extrait est analysé sur colonne de CM Séphadex C 25, et une partie aliquote de chaque fraction collectée est incorporée au scintillateur de KENNEDY, puis comptée au compteur à scintillation. Avec cette colonne, nous savons que le CoCl_2 est élué dans la fraction 15 (maximum de radioactivité obtenu avec un échantillon de $^{58}\text{CoCl}_2$ déposé sur la colonne); la vitamine B_{12} dans la fraction 20.

Le graphique I donne le résultat relatif à cette analyse. Nous constatons la présence d'une radioactivité importante dans les fractions 14, 15 et 16, correspondant au CoCl_2 , puis une radioactivité décroissante, mais encore assez élevée, jusqu'à la fraction 21, et de plus en plus faible jusqu'à la fraction 28. Ces résultats sont difficilement exploitables étant donné l'absence d'un pic de radioactivité correspondant à la B_{12} , nettement séparé du premier.



GRAPHIQUE I

CHROMATOGRAPHIE SUR CM SEPHADEX C 25.

en haut : à partir des références : $^{58}\text{CoCl}_2$ ou $^{58}\text{CoB}_{12}$, mélangées à un extrait végétal traité sur Dowex 50 W x 2 et chromatographiées.

en bas : à partir d'un extrait de plantules de Colza ayant germées stérilement en présence de $^{58}\text{CoCl}_2$. Cet extrait a aussi été préalablement traité sur Dowex 50 W x 2.

Colonne : 2,5 x 40 cm ; éluant : tampon phosphate M/45 pH 6,25.
fractions : 5 ml. ; rythme d'éluion : 55 ml/h.

Nous pensons que cette radioactivité dans les fractions postérieures à la fraction 17 est due à l'incorporation du ^{58}Co dans des molécules n'ayant peut être aucune similitude avec les cobalamines, qui interfèrent dans notre fractionnement en donnant des résultats illisibles. Ces composés incorporant le cobalt sont peut être des enzymes telles que la malate déshydrogénase, la pyruvate décarboxylase, l'oxaloacétate décarboxylase, ou des peptidases (carboxypeptidases et glycyglycine dipeptidase) intervenant dans le métabolisme des tissus végétaux. HOFNER (1969) signale aussi que le cobalt peut former des complexes avec des substances positives à la ninhydrine ou avec des sucres.

Nous avons expérimenté d'autres types de purification telle que l'utilisation de l'Amberlite IRC 50 pour essayer d'éliminer la totalité du $^{58}\text{CoCl}_2$ avant passage sur CM Séphadex. Nous n'avons cependant jamais pu obtenir une absence totale de radioactivité dans l'éluat ammoniacal de cette résine sur laquelle avait été initialement passé un mélange composé d'un extrait végétal additionné d'une solution de $^{58}\text{CoCl}_2$. De même l'utilisation en ultrafiltration des membranes filtrantes de type Pellicon PSAC (Millipore) n'a donné aucun résultat intéressant. Enfin, les séparations chromatographiques ou électrophorétiques sur papier ont toujours été masquées par la présence de ce CoCl_2 . Il semble d'ailleurs que BABOTH (1965) ait eu les mêmes ennuis, en particulier pour des séparations chromatographiques d'extraits de plantules de pois après incorporation de $^{60}\text{CoCl}_2$.

Cette difficulté technique nous a fait provisoirement abandonner cet objectif de recherche et nous avons alors essayé d'aborder le problème d'une façon différente, sans effectuer de marquage, en utilisant un matériel se prêtant facilement à une expérimentation précise : une culture tissulaire de carotte verte.

b) Expérimentation basée sur l'utilisation d'une culture tissulaire :

La souche de carotte verte utilisée provient du Laboratoire de Physiologie végétale où elle était cultivée "in vitro" sur milieu de Heller complet additionné de glucose à raison de 30 g/l, d'acide β indolyl acétique à raison de 0,1 mg/l, et solidifié avec de l'agar agar. Afin d'éliminer la présence exogène éventuelle de vitamine B_{12} dans ce tissu (celle-ci pouvant provenir des produits utilisés pour la préparation du milieu ou de la gélose), nous avons mis au point une technique très simple permettant la culture de cette souche sur milieu liquide, dont la composition peut être ainsi parfaitement connue.

Cette technique consiste à utiliser les tubes de culture à ergots précédemment décrits (page 20), en plaçant sur les ergots une rondelle de papier Whatman n° 3 munie d'une languette pouvant plonger dans le liquide nutritif. Ces tubes, parfaitement propres, contiennent environ 20 ml du milieu de culture précédent, mais préparé avec de l'eau bidistillée, des sels très purs et

du glucose NBC. Ils sont munis de bouchons en coton hydrophile et après incorporation des cultures, recouverts de papier d'étain et incubés à 18°C avec 12 heures de lumière par jour.

Nous avons ainsi procédé à deux repiquages successifs à partir de la souche origine cultivée sur milieu gélosé, avec une période de 4 à 5 semaines séparant chaque repiquage, et en ensemençant toujours des fragments peu volumineux. Le 3ème repiquage était destiné à donner les tissus à partir desquels les extractions de B₁₂ étaient prévues. Il a été effectué dans 2 séries de tubes préparés à partir du même milieu, mais dont l'une contenait en plus du cobalt (0,1 mg/1 sous forme de CoCl₂ 6H₂O).

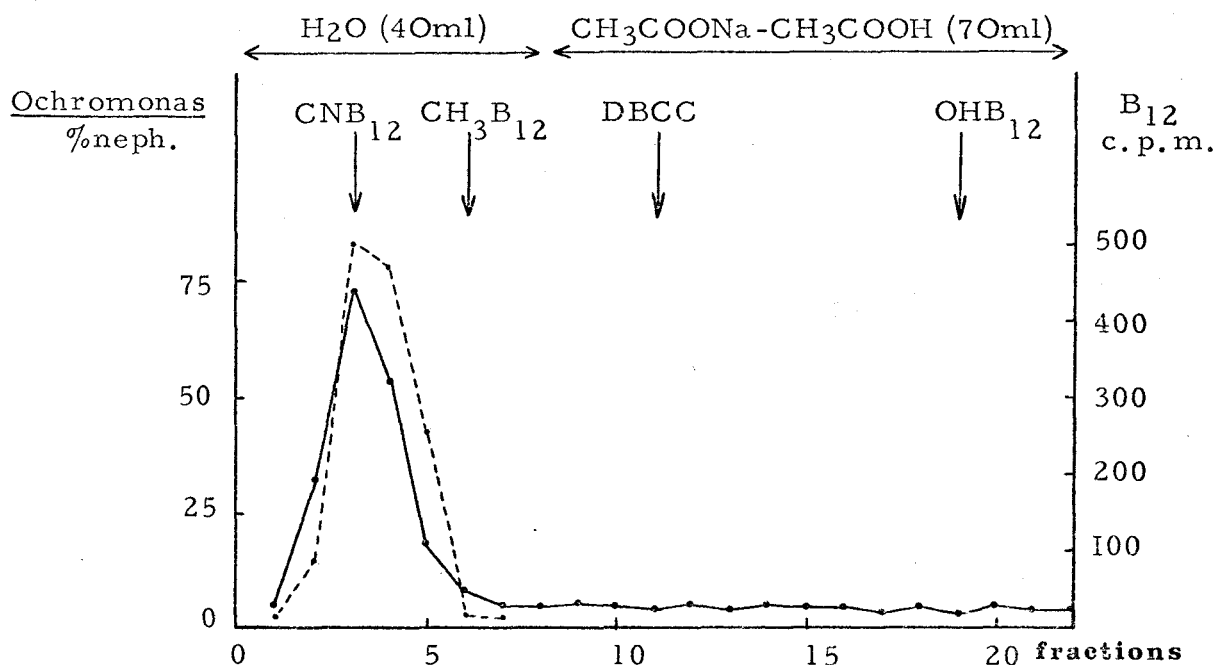
Après 40 jours d'incubation, les cultures tissulaires provenant de chacune de ces séries sont prélevées, pesées, et l'extraction s'opère suivant les modalités opératoires précédemment décrites. Les extraits obtenus sont ensuite passés sur résine Amberlite IRC 50 utilisée sous forme H⁺ (obtenu par passage d'HCl 2N suivi d'un lavage à l'eau bidistillée fraîche) et éluée par une solution N. d'ammoniaque (NH₄ OH "Suprapur" Merck dans eau bidistillée). Après concentration à un volume tel que 1 ml d'extrait corresponde à 1 g. de tissu frais et stérilisation sur filtre Millipore, un dosage est effectué avec O. malhamensis.

Par rapport à la courbe d'étalonnage obtenue avec une solution étalon de vitamine B₁₂ NBC, les cultures tissulaires de carottes issues des tubes dépourvus de cobalt donnent une réponse équivalente à 0,015 µg de B₁₂/g. de tissu, et les cultures provenant des tubes contenant du cobalt donnent, dans les mêmes conditions 0,014 µg/g de tissu. (Précisons que le CoCl₂, utilisé à la concentration de 0,1 mg/1 de milieu de culture, n'a provoqué aucune variation du poids frais des cultures de carottes par rapport au milieu normal).

Ces résultats sont assez surprenants car si les tissus de carottes vertes sont capables de synthétiser la cyanocobalamine, leur teneur devrait être fonction, dans certaines limites, de la présence de cobalt dans le milieu ambiant. Pourtant, ces résultats sont parfaitement significatifs car nous avons pu vérifier rigoureusement la proportionnalité des concentrations vitaminiques trouvées en fonction des volumes d'extraits employés (qui s'échelonnent entre 0,1 ml et 4 ml, chaque essai étant effectué en double exemplaire).

Afin de préciser la nature du facteur vitaminique présent dans les tissus de carottes dépourvus de cobalt, et qui permet la croissance d'O. malhamensis, nous avons essayé d'en étudier son comportement chromatographique sur colonne de SP Séphadex et sur papier.

Le choix du SP Séphadex C 25 (Na^+) dont la technique d'utilisation pour l'étude des cobalamines a été récemment décrite par TORTOLANI et coll. (1970), nous a semblé convenir le mieux au problème posé par la nature et l'origine de ce facteur de croissance : Ce Séphadex permet facilement de séparer la cyanocobalamine de ses coenzymes (dans la molécule desquels un groupement adénine est relié à l'atome de cobalt, à la place de l'ion CN^-), et d'autres cobalamines telles que la méthyl et l'hydroxycobalamine.



GRAPHIQUE II

Chromatographie sur SP Séphadex C 25 du facteur vitaminique présent dans les cultures stériles de carottes et permettant la croissance d'*O. malhamensis* ATCC 11.532.

- Colonne : 0,9 x 20 cm - volume des fractions : 5 ml - éluant : eau bi-distillée (40 ml) puis tampon acétate de sodium 0,05 M pH 5,0 (70 ml) - rythme d'élution : 20 ml/h.

- en haut du graphique : ordre d'élution obtenu par TORTOLANI et coll. (1970) à partir des produits de référence suivant : cyanocobalamine (CNB_{12}), hydroxycobalamine (OHB_{12}), méthyl cobalamine (CH_3B_{12}) et diméthylbenzimidazolyl cobamide coenzyme (DBCC).

- en trait plein : croissance d'*O. malhamensis* exprimée en % néphélogéométrie après chromatographie de l'extrait végétal.

- en trait discontinu : radioactivité obtenue dans chaque fraction après dépôt d'un échantillon de cyanocobalamine ⁵⁸Co sur la colonne.

Le résultat de cette analyse est représenté sur le graphique 2. Après récupération des 22 fractions provenant de l'élution de l'extrait végétal initialement traité par l'Amberlite IRC 50, par 40 ml d'eau bidistillée et 70 ml d'un tampon acétate ; celles-ci reçoivent le milieu de culture nécessaire au développement d'O. malhamensis, mais déficient en B₁₂ (Bacto B₁₂ Ochromonas medium Difco), et après inoculation de la souche et incubation, la croissance de l'algue dans chacune des fractions est mesurée par néphélométrie. On constate alors que le facteur vitaminique présent dans l'extrait végétal correspond exactement à l'ordre d'élution de la cyanocobalamine, confirmé par le passage sur la colonne, d'une solution de vitamine B₁₂ radioactive.

De même, la chromatographie sur papier Whatman n° 1, effectuée à partir de l'extrait de carottes en employant 2 systèmes solvants : Isopropanol/eau (7/1 v/v) et Butanol sec./eau (2/1 v/v) donne, pour le facteur présent dans les carottes vertes, le même Rf. que la cyanocobalamine ⁵⁸Co chromatographiée dans les mêmes conditions en présence d'extrait végétal (Rf. 0,21 pour le 1er système solvant, et 0,30 pour le second).

c) Conclusion :

Les tissus végétaux cultivés stérilement synthétiseraient donc un facteur de croissance favorisant le développement d'O. malhamensis. Ce facteur présente des caractéristiques chromatographiques identiques à celles de la cyanocobalamine mais nous n'avons pu, par incorporation de cobalt radioactif au milieu de culture de plantules cultivées stérilement, ou par élimination de tout apport de sels de cobalt au milieu de culture de tissus de carottes, mettre en évidence la synthèse de cobalamines par les tissus végétaux. Pour cette dernière expérience, nous pouvons d'ailleurs émettre 2 hypothèses en fonction des résultats obtenus : soit que les sels employés pour la fabrication des milieux (la plupart de la série RP de Prolabo) contiennent suffisamment de cobalt à l'état de traces pour permettre aux tissus de synthétiser des cobalamines ; soit que la souche test employée : O. malhamensis, peut répondre à d'autres facteurs que les cobalamines dont les caractéristiques chromatographiques seraient très proches. Cette réponse pourrait d'ailleurs être très inférieure proportionnellement à celle qui est obtenue avec la cyanocobalamine, ce qui ex

pliquerait la très faible concentration trouvée (de l'ordre de 0,01 à 0,02 μg).

Cependant, si les tissus végétaux sont capables de synthétiser la vitamine B_{12} , celle-ci n'aurait aucune activité métabolique puisque nous n'avons jamais trouvé de méthyl cobalamine ni de forme coenzymatique de vitamine B_{12} à partir des extraits de carottes (chromatographie sur SP Sephadex)

Par contre, la synthèse éventuelle de cobamide par les végétaux constitue un problème très intéressant dans le cadre de l'évolution. En effet, nous savons depuis longtemps que les bactéries et les algues peuvent synthétiser la vitamine B_{12} . Il en serait de même chez les champignons (VALENCIA 1965 par exemple) mais pour les végétaux supérieurs on a jamais pu démontrer cette potentialité, et leur croissance n'exige jamais sa présence. Chez les animaux, les tissus ne peuvent la synthétiser, mais celle-ci est cependant nécessaire pour un développement normal de l'organisme. Les végétaux, dans cette échelle, se situent donc à une charnière. On pourrait ainsi concevoir que le génôme de la cellule végétale contienne pas les potentialités permettant la synthèse des cobalamines, mais peut être une partie seulement de ces potentialités, permettant la synthèse de cobamides ou de substances proches.

Signalons d'ailleurs un cas particulier dans le règne végétal, qui met en évidence une exigence vis à vis de la vitamine B_{12} : c'est le cas de tissus tumoraux de Picea glauca qui, d'après REINERT et WHITE (1956) ne se développent "in vitro" que si le milieu de culture contient 1,5 $\mu\text{g}/\text{l}$ de cyanocobalamine. Ce phénomène, d'après nous, peut être interprété de diverses façons : si on admet que dans la cellule non tumorale, un gène est responsable de la synthèse de substances proches des cobalamines intervenant dans un métabolisme encore inconnu, on peut alors expliquer l'exigence présente par une altération de ce gène. Mais on peut aussi admettre que dans ce tissu tumoral une altération du génôme a provoqué l'absence d'un processus biochimique particulier, par exemple la synthèse d'un acide aminé, et que la B_{12} compense cette déficience en rétablissant la voie métabolique normale. Dans ce cas, la vitamine jouerait le même rôle que dans les tissus d'origine animale.

CONCLUSION GENERALE.

Dans les conditions naturelles, nous pensons que la vitamine B₁₂ synthétisée par la microflore rhizosphérique peut jouer un rôle à deux niveaux différents, l'un se situant à l'extérieur de la plante, dans le sol, l'autre dans les tissus de la plante, au moins au moment de leur décomposition.

Dans le sol, il est évident que les nombreux germes exigeant cette vitamine pour leur croissance, pourront bénéficier de l'apport dû à la présence de la microflore rhizosphérique. Ainsi, au cours de l'année, il existe probablement un cycle pour ces germes exigeants, leur densité maximum se situant après développement de la végétation (automne-hiver), leur densité minimum au moment de la germination et de la croissance active des plantules (printemps). Leur rôle est parfois connu : ils interviennent par exemple à certaines étapes de la dégradation des molécules complexes se trouvant dans le sol, ou dans l'humification. Dans le métabolisme de ces germes, la B₁₂ n'intervient généralement pas à l'état libre, mais sous une forme coenzymatique synthétisée par un B₁₂ coenzyme synthétase, capable de catalyser 4 types de réactions chimiques (STADTMAN 1971) : dans le clivage d'une liaison C - C suivi d'un réarrangement du squelette carboné (ex : éthanolamine mutase) ; dans l'élimination de H₂O ou NH₃ d'une molécule (ex : éthanolamine déaminase) ; dans la migration d'un groupe aminé (ex : ornithine mutase) ; dans la réduction d'une molécule (ex : réduction du ribonucléotide en désoxyribonucléotide).

Dans le métabolisme de la plante elle-même, si la vitamine B₁₂ d'origine exogène peut intervenir, elle agira probablement suivant le même mode d'action que chez les animaux, dans les tissus desquels on a pu récemment mettre en évidence son rôle dans la synthèse du ⁵N - méthyl - tétrahydrofolate qui permet le transfert d'un groupement méthyl à l'homocystéine pour former la méthionine (MANGUM et coll. 1969, KERWAR et coll. 1971) et dans l'isomérisation du méthyl malonyl CoA en succinyl CoA (MUDD et coll. 1969, ROSENBERG et coll. 1969). Mais cette B₁₂ exogène peut avoir un autre rôle

très vraisemblable dans les tissus végétaux, au moment de leur décomposition : en effet, l'attaque des macromolécules constituant en particulier le squelette des cellules telles que les pectocelluloses ou les substances de réserves cellulaires n'est souvent possible que grâce à l'intervention de germes telluriques particuliers, très exigeants en vitamines en général, en B₁₂ plus particulièrement. Ainsi, grâce à la présence de cette vitamine dans les tissus la multiplication de ces germes et leur dissémination est probablement accélérée, et la décomposition des tissus végétaux plus rapide. Notons d'ailleurs que des résultats obtenus par ROUATT et LOCHHEAD (1955) viennent à l'appui de cette hypothèse puisqu'ils démontrent que lorsque les plantes se décomposent dans le sol, on peut mettre en évidence une densité beaucoup plus élevée de bactéries exigeantes en B₁₂.

4^e PARTIE

ETUDE PARTICULIERE

DE LA NATURE DES COMPOSES FOLIQUES

PRESENTS DANS LA RHIZOSPHERE DU COLZA

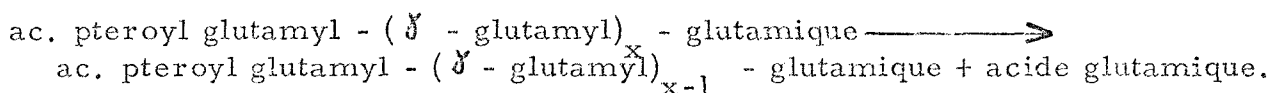
Dans la 1^{ère} partie de ce mémoire, lors de l'étude de l'évolution des vitamines hydrosolubles présentes dans le substrat de germination des plantules de Colza, nous avons noté, comme pour la vitamine B₁₂, une augmentation apparente de la quantité d'acide folique dans la rhizosphère, par rapport aux semis stériles. Cependant, ainsi que nous l'avons précisé dans la publication relative à la spécificité de la biosynthèse des facteurs vitaminiques dans la rhizosphère (Ann. Inst. Pasteur, page 49), les résultats obtenus ne nous permettent pas d'affirmer qu'il y a effectivement synthèse d'acide folique ou de ses dérivés par les bactéries rhizosphériques. Nous constatons simplement dans les semis une augmentation de la concentration d'un composé folique permettant la croissance de Streptococcus faecalis ATTC 8.043, souche test employée pour les dosages. Ne connaissant pas la nature du ou des composés foliques excrétés par le Colza, il nous a semblé utile de reprendre ce problème et d'en approfondir son étude.

En recherchant parallèlement les potentialités de synthèse de composés foliques par des souches bactériennes isolées de la rhizosphère du Colza, ou par des souches isolées à partir de la microflore tellurique de départ, nous n'avons pas constaté de différences très significatives. Ce résultat nous incite donc à penser qu'il n'y a pas effectivement synthèse de folates d'origine bactérien dans la rhizosphère du Colza. Il semblerait plutôt que dans nos dosages, Str. faecalis ne soit pas stimulé par la même forme vitaminique suivant que ceux-ci sont réalisés à partir des éluats de cultures stériles de Colza, ou à partir des éluats de cultures effectuées en présence d'une microflore.

Comme la sensibilité de la réponse de Str. faecalis vis à vis des formes conjuguées de l'acide folique, et plus particulièrement des formes polyglutamiques, est très faible, il est possible de supposer que le, ou les composés foliques éliminés par le système racinaire du Colza le soient sous forme conjuguée et que, par l'intermédiaire des bactéries rhizosphériques, on ait une dégradation de cette molécule avec libération de la forme libre permettant la croissance optimum de Str. faecalis.

Afin de contrôler cette hypothèse, nous avons repris nos expériences en comparant, par rapport aux dosages effectués précédemment, les résultats obtenus après incorporation, dans les éluats de cultures stériles, d'une préparation enzymatique riche en γ glutamyl carboxy peptidase, destinée à hydrolyser les conjugués de l'acide folique (acide ptéroyl glutamique) éventuellement présents dans ces éluats.

Plusieurs préparations enzymatiques peuvent être employées : les extraits provenant de pancréas de poulet, de reins de porc, ou des "glandes à gaz" de Physalia physalis. On a démontré que la γ glutamyl carboxypeptidase présente dans ces extraits peut hydrolyser les substrats contenant des résidus polyglutamiques, en libérant l'acide glutamique, mais uniquement lorsque les groupements carboxyliques de celui-ci sont, pour le premier, libre, et pour le second lié au groupement aminé du γ carboxyl de l'acide glutamique suivant, selon KASENKO et LASKOWSKI (1948). Cette hydrolyse peut être représentée suivant la formule :



Avec les préparations enzymatiques de pancréas de poulet, le produit final de l'hydrolyse est un dérivé diglutamyl (KASENKO et LASKOWSKI 1948), alors que les préparations provenant des glandes de Physalia et du rein de porc conduisent à un monoglutamate (respectivement : NORONHA et SILVERMAN 1962 ; BIRD et coll. 1968).

Nous avons utilisé, pour nos essais, une préparation enzymatique obtenue à partir de pancréas de poulet. Celle-ci est la plus couramment employée, probablement parce que ces extraits pancréatiques de poulet sont commercialisés (DIFCO), et que l'activité de l'extrait enzymatique de rein de porc est parfois affectée par la présence d'inhibiteurs dans les échantillons traités (SCHERTEL et coll., 1965). Afin d'éliminer les folates libres présents dans les autolysats pancréatiques, nous avons adopté la technique de purification de MIMS et LASKOWSKI, modifiée par BIRD et coll. (1965).

Dans ce chapitre relatif au problème des composés foliques présents dans la rhizosphère du Colza, nous étudierons, dans un premier point, la nature des folates éliminés par les plantules de Colza et leur évolution en présence d'une microflore ; et dans un second point, la comparaison entre les folates des exsudats racinaires du Colza et ceux de la plantule elle-même, afin de préciser quelques caractéristiques physiologiques et biochimiques propres à ce phénomène.

A - ETUDE DES COMPOSES FOLIQUES PRESENTS DANS LA RHIZOSPHERE ET LEUR EVOLUTION.

Les résultats de cette étude ont été publiés dans les Comptes-Rendus (1969, 268).

MICROBIOLOGIE DU SOL. — *Etude des composés foliques présents dans la rhizosphère des plantules de colza (Brassica Napus oleifera). Note (*) de M. Roland Blondeau, présentée par M. Roger Heim.*

Le système racinaire de la plantule de colza élimine une forme conjuguée de l'acide folique. Cette molécule, sous l'action des microorganismes de la rhizosphère, se dégrade en libérant l'acide ptéroyl glutamique.

Dans des Notes précédentes [(²), (⁴)], nous avons montré que le milieu de culture de jeunes plantules de colza contenant une microflore tellurique, s'enrichit en certains facteurs vitaminiques, et en particulier en un facteur de croissance pour *Streptococcus faecalis*, utilisé couramment pour le dosage microbiologique de l'acide folique. La réponse donnée par ce microorganisme étant fonction de la forme sous laquelle se présente l'acide folique, il nous fallait, avant de conclure, préciser la nature de cette forme vitaminique dosée, d'autant plus que les excréta radicaux utilisés ne sont pas traités par voie enzymatique avant le dosage.

TECHNIQUES. — La technique de culture des graines de colza a déjà été décrite en détail (³) : la germination est effectuée dans des tubes spéciaux permettant une élution *in situ* des substances éliminées par le système racinaire des plantules.

Les graines (variété *Crésus*), après stérilisation, sont ensemencées soit dans des tubes contenant un substrat de culture stérile (lots ST) soit dans des tubes contenant une microflore tellurique active (lots MT).

Après chaque élution, effectuée avec de l'eau bidistillée, les éluats sont passés sur filtres « Millipore » (0,45 μ) puis sont concentrés sous vide et lyophilisés.

Les dosages vitaminiques ont été pratiqués à l'aide d'une méthode microbiologique suivie d'une lecture néphélométrique.

DOSAGE DES COMPOSÉS FOLIQUES PRÉSENTS DANS LES ÉLUATS. — Afin de se rendre compte si la nature des composés foliques présents dans les excréta obtenus en conditions stériles et les excréta résultant d'une activité bactérienne étaient identiques, le dosage de l'« activité folique » a été simultanément effectué avec 2 souches tests : *Streptococcus faecalis* ATCC 8043 et *Lactobacillus casei* ATCC 7469, en tenant compte des indications données par Anderson et Corvan (¹). *L. casei* répond non seulement à la présence de l'acide folique libre (acide ptéroyl glutamique) et à ses dérivés, mais aussi aux formes conjuguées, en particulier aux formes polyglutamiques. *Str. faecalis* par contre présente peu d'affinité vis-à-vis de ces composés, mais il est stimulé par l'acide ptéroïque.

Les résultats, rassemblés dans le tableau I, prouvent que les éluats provenant de cultures stériles (ST) et non stériles (MT) ne contiennent pas la même forme vitaminique.

ACTION DE CONJUGUASES SUR LES EXCRÉTATS DE CULTURES STÉRILES. — Les résultats précédents laissant supposer la présence d'une forme conjuguée dans les éluats de cultures stériles, une série de dosages a été entreprise après action d'un extrait

(2)

TABLEAU I

Composés foliques présents dans les éluats de cultures
de plantules de colza (en $m\gamma/g$ de colza ensemencé)

Souche test	Conditions expérimentales	Durée de la germination			
		3 jours	6 jours	9 jours	12 jours
<i>Str. faecalis</i>	ST	78,4	154	173,6	182
	MT	134,4	263,2	313,6	274,4
<i>L. casei</i>	ST	190,4	266	324,8	330,4
	MT	198,8	274,4	336	285,6

enzymatique de pancréas de poulet (DIFCO) riche en glutamyl carboxypeptidases.

La réaction enzymatique est effectuée à 40 °C sous toluène et à l'obscurité, à partir d'une solution de conjuguases pancréatiques à 1,2 %, employée à raison de 1 volume pour 10 volumes d'éluat.

Après 0, 5, 10 et 20 h d'incubation, la réaction est stoppée par autoclavage, et les dérivés foliques sont dosés par *Str. faecalis* et *L. casei*. Une expérience témoin est effectuée parallèlement à partir d'une solution enzymatique préalablement inactivée par autoclavage.

Les résultats (tableau II) montrent la « libération » d'une forme active d'acide folique dosable par *Str. faecalis*.

TABLEAU II

Action de conjuguases sur le composé folique présent
dans les éluats stériles (résultats exprimés en $m\gamma/ml$ d'éluat)

Conditions expérimentales	Souche test	Temps d'incubation			
		0 h	5 h	10 h	20 h
Conjuguases inactivées (témoin)	<i>Str. faecalis</i>	4,84	4,80	4,80	4,80
	<i>L. casei</i>	4,84	7,71	7,94	8,05
Conjuguases actives	<i>Str. faecalis</i>	8,82	8,82	8,90	8,94
	<i>L. casei</i>	8,82	8,82	8,90	8,94

ETUDE DES COMPOSÉS FOLIQUES PAR GEL FILTRATION. — Les excréats de 100 plantules obtenus après 4, 7 et 10 jours de germination sont déposés sur des colonnes de Sephadex G 50 (2,5 × 50 cm) éluées par un tampon phosphate à pH 7. Cinquante-cinq fractions de 5 ml sont ainsi recueillies avec un rythme d'éluat de 30 ml/h. La présence des composés foliques dans les tubes collectés est ensuite décelée simultanément par *Str. faecalis* et *L. casei*.

Les résultats, présentés dans le graphique, prouvent que le composé folique éliminé par les plantules stériles (maximum d'activité dans la fraction 36) est différent de celui que l'on retrouve en présence d'une microflore (maximum d'activité dans la fraction 42) et qui correspond à l'acide ptéroyl glutamique.

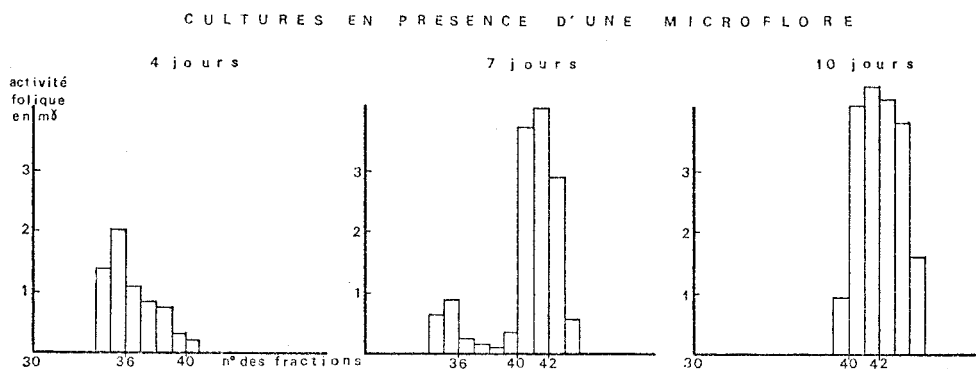
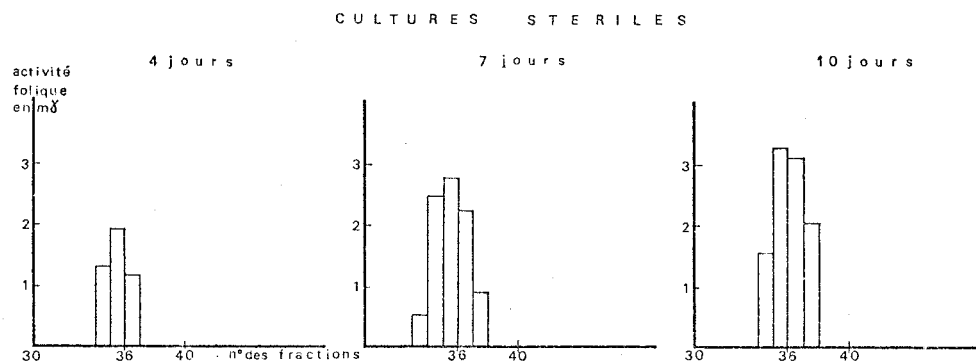
(3)

CARACTÉRISATION DE LA FORME CONJUGUÉE PAR CHROMATOGRAPHIE SUR PAPIER.

— Les composés foliques présents dans les éluats ST et MT, après adsorption sur charbon Norit et élution par l'alcool ammoniacal suivant une technique utilisée par Sauberlich (5), sont étudiés par chromatographie ascendante sur papier « Whatman n° 1 », à l'obscurité.

3 systèmes d'élution ont été utilisés :

1. N Butanol/acide acétique/eau 4/1/5 (v/v).
2. K_2HPO_4 à 1 % + 0,2 % d'acide éthylène diamine tétraacétique (EDTA).
3. N Butanol/éthanol/ammoniaque ($d = 0,92$)/eau 15/50/10/25 (v/v).



Composés foliques présents dans les éluats ST et MT
après passage sur Sephadex G 50 (dosage avec *Str. faecalis*)

Après migration, les chromatogrammes correspondant à l'élution de chaque tache sont découpés en bandes de 1×4 cm. Celles-ci, éluées dans des tubes contenant de l'eau bidistillée additionnée d'ascorbate de sodium, sont agitées pendant 1 h à l'obscurité.

Un dosage microbiologique permet ensuite de déceler le dérivé folique dans ces tubes.

Le tableau III donne les Rf correspondant au composé folique présent dans les cultures stériles, et à l'acide ptéroyl glutamique obtenu soit à partir d'une solution standard, soit à partir d'une culture de plus de 7 jours et non stérile de colza.

(4)

TABLEAU III

Rf du composé folique présent dans les cultures stériles

Substances chromatographiées	Eluants employés		
	1	2	3
Eluat ST	0,72	0,82	0,34
Acide ptéroyl glutamique .	0,55	0,40	0,22

CONCLUSION. — Le système racinaire des plantules de colza élimine un composé folique qui assure la pleine croissance de *L. casei*, mais seulement la demi-croissance environ de *Str. faecalis*. Ce composé a un poids moléculaire très supérieur à celui de l'acide ptéroyl glutamique, et il se transforme en une forme biologiquement active sous l'action d'un extrait de conjugases.

Dans la rhizosphère des plantules, cette forme conjuguée se dégrade en donnant la forme libre de l'acide folique, sous l'influence de la flore bactérienne. Cette action enzymatique, déjà détectable après 4 jours de germination, est presque totale après 7 jours, dans nos conditions expérimentales.

(*) Séance du 24 mars 1969.

(1) B. B. ANDERSON et J. D. COWAN, *J. Clin. Path.*, 21, 1968, p. 85.

(2) R. BLONDEAU, *Comptes rendus*, 266, Série D, 1968, p. 2017.

(3) R. BLONDEAU, *Bull. Soc. Bot. Nord Fr.*, 21, 1968, p. 99.

(4) R. BLONDEAU, *Ann. Inst. Pasteur*, Lille, 20, 1969 (sous presse).

(5) H. E. SAUBERLICH, *J. Biol. Chem.*, 195, 1952, p. 337.

(Laboratoire de Cryptogamie, Faculté des Sciences,
B. P. n° 36, 59-Lille, Nord.)

B - COMPARAISON DES FOLATES PRESENTS DANS LA PLANTULE DE COLZA ET DANS SES EXSUDATS.

Dans les tissus des végétaux, on connaît surtout les formes libres des folates qui sont : l'acide folique, l'acide tétrahydrofolique (sa forme active) et les dérivés formylés et méthylés. Leur rôle coenzymatique est important puisque ces composés interviennent dans un grand nombre de processus métaboliques comportant l'addition de chaînons en C_1 .

Or, à l'aide des techniques que nous avons employées, nous venons de constater qu'il ne semble exister dans les excrétats du Colza, que des formes foliques conjuguées. A priori, nous n'avons aucune raison de penser que le système racinaire du Colza n'élimine sélectivement que les folates conjugués, molécules à poids moléculaire élevé, et non les formes libres. Sinon, il faudrait alors admettre que ces molécules conjuguées soient activement excrétées, au sens strict du terme, comme substances de déchets.

Cette éventualité est difficile à concevoir car pour les bactéries (WRIGHT 1958, RABINOWITZ et HIMES 1960, JONES et coll. 1961), comme pour le tissu hépatique (JAENICKE et BRODE 1961), on a pu démontrer que les folates polyglutamiques étaient aussi actifs, et même parfois plus actifs que les monoglutamates, en tant que cofacteur dans les réactions enzymatiques.

On peut aussi concevoir, in vitro, une action enzymatique dans le milieu de culture des plantules, provoquant, par l'intermédiaire d'une peptide synthétase elle-même éliminée par les racines, la formation des molécules conjuguées. Ce phénomène est pourtant peu probable, et en présence d'une microflore, l'action bactérienne que nous avons signalée ne serait pas apparue.

Les résultats que nous avons obtenus sont cependant plus facilement interprétables si les plantules de Colza contiennent des teneurs très élevées de formes conjuguées de l'acide folique ou de ses dérivés, et c'est dans ce but que nous avons entrepris d'étudier plus en détail, à l'aide de nouvelles méthodes de séparation, les composés foliques présents dans les plantules et dans leurs excrétats.

Pour mener à bien ces analyses, nous avons utilisé une gamme de 3 souches test pour les dosages, et nous avons fractionné nos extraits sur colonne de Sephadex ou sur colonne de D.E.A.E. Cellulose.

I - TECHNIQUES EMPLOYEES.

1 - Extraction des composés foliques à partir des plantules :

Dès le prélèvement, les parties aériennes des plantules sont broyées à l'aide d'un appareil de type "Ultra Turrax", dans un tampon phosphate de Na 0,015 M. pH 6,5, contenant 0,5 % d'ascorbate de Na. La présence de cet ascorbate est indispensable pour éviter l'oxydation de certains folates, en particulier le tétrahydrofolate. Ensuite, le broyat est soumis au bain marie 75°C. pendant 30', à l'abri de la lumière. Dans ces conditions, on risque peu d'isomérisation du ^{10}N formyl tétrahydrofolate en ^5N formyl tétrahydrofolate, phénomène qui se produit à une température supérieure. Après brusque refroidissement à la neige carbonique, on centrifuge à 18.000 g. pendant 20', et le surnageant est concentré sous vide jusqu'à un volume tel que 1 ml corresponde à 1 g. de poids frais initial. Enfin, il est éventuellement conservé au congélateur.

2 - Dosages microbiologiques et produits de références :

Les souches test utilisées sont : Lactobacillus casei (ATCC 7.469), Streptococcus faecalis (ATCC 8.043) et Pediococcus cerevisiae (ATCC 8.081). Elles sont repiquées périodiquement sur le "Bacto-Lactobacilli agar AOAC" (DIFCO), et le "Bacto-Lactobacilli Broth AOAC" (DIFCO) est employé pour la préparation des inoculum. Les milieux de base utilisés sont : pour L. casei, le "Bacto-Folic Acid Casei Medium", pour Str. faecalis, le "Bacto-Folic Acid AOAC Medium" et pour P. cerevisiae, le "CF Assay Medium". Tous ces milieux proviennent de la firme DIFCO. Remarquons que BERTAUX et coll. (1969) ont modifié le milieu de base pour Str. faecalis de façon à augmenter sa sensibilité, mais nous n'avons pu adopter leur méthode, la publication étant parue au moment où ce travail était presque terminé.

Pour l'établissement des gammes étalons de dosage, nous avons utilisé comme référence, pour ces souches, non plus l'acide folique puisqu'il n'est pas utilisable pour P. cerevisiae, mais la leucovorine (sel calcique de l'acide ^5N - formyl tétrahydrofolique), et les résultats sont alors exprimés en équivalents de μg d'acide ^5N - formyl tétrahydrofolique. (Signalons que seule la forme L est biologiquement active et que les dilutions de cette leucovorine sont effectuées avec des solutions d'ascorbate de sodium à 0,5 %, pH 6).

Dans le tableau I, nous avons rassemblé les résultats relatifs aux spécificités des souches employées vis à vis des principaux composés foliques connus. Nous avons simplifié l'écriture en proposant dans ce tableau et dans le texte ensuite, les abréviations suivantes : Pte glu pour l'acide pteroyl mono glutamique (acide folique) ; H_4 Pte glu et H_2 Pte glu pour les acides tétra et dihydrofolique ; 5 formyl - H_4 -Pte glu et 10 formyl H_4 Pte glu pour les acides 5N formyl et ^{10}N formyl tétrahydrofolique ; 5 Méthyl - H_4 -Pte glu pour l'acide 5N méthyl tétrahydrofolique; et Pte (glu) $_n$ pour les pteroyl conjugués.

	<u>L. casei</u>	<u>Str. faecalis</u>	<u>P. cerevisiae</u>
ac. pteroylque	-	+	-
Pte glu	+	+	-
H_2 Pte glu	+	+	-
H_4 Pte glu	+	+	+
5 et 10 formyl H_4 Pte glu	+	+	+
5 méthyl H_4 Pte glu	+	-	-
Pte (glu) $_2$	+	+	+
Pte (glu) $_7$	-	-	-

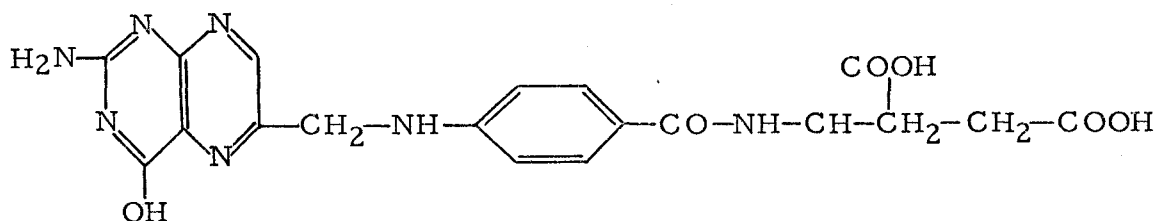
TABLEAU I.

Activité des analogues de l'acide folique vis à vis des souches test utilisées (*)

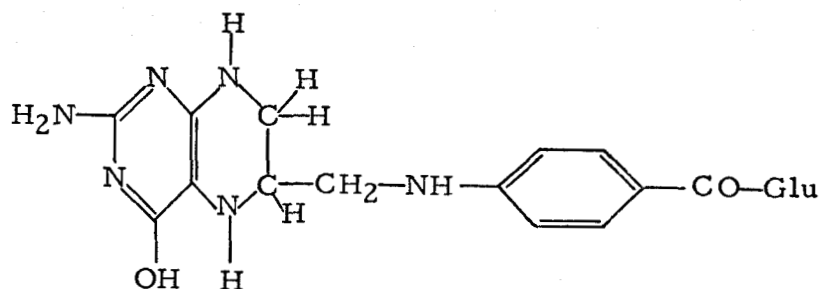
* d'après : JUKES et STOKSTAD (1948), FLYNN (1964), WHITE et WOODS (1965), SCHERTEL et coll. (1965), BIRD et coll. (1968).

Les produits de références utilisés sont les 4 composés foliques actuellement disponibles sur le marché c'est à dire :

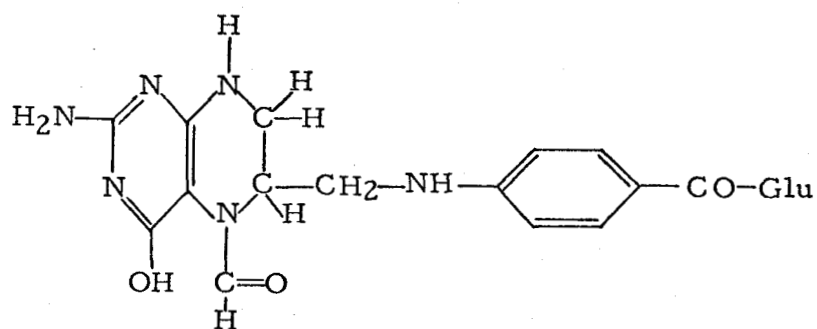
a) l'acide pteroyl glutamique (acide folique) produit par "N.B.C." :



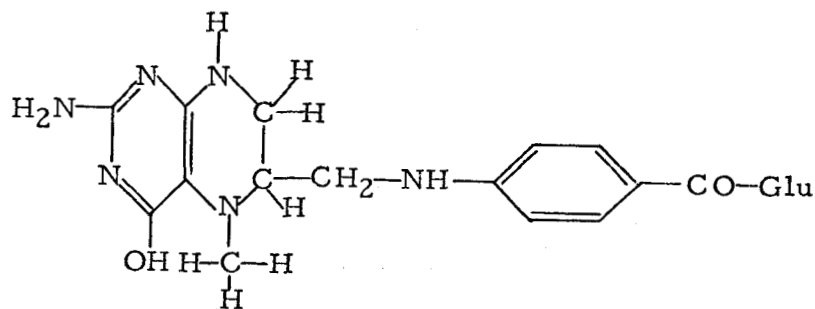
b) l'acide 5, 6, 7, 8 tétra hydro pteroyl glutamique, produit par "Sigma".



c) l'acide ⁵N-formyl tétra hydro pteroyl glutamique (leucovorine), produit par "Lederle" sous forme de sel calcique.



d) l'acide ⁵N-méthyl tétra hydro pteroyl glutamique, produit par "Sigma" sous forme de sel de baryum.



Le tableau II qui suit donne la sensibilité des souches pour ces composés foliques. Les résultats sont exprimés en % néphélométrique par rapport au 5 formyl H₄ Pte glu, prit arbitrairement comme référence. Les doses de produits incorporés dans les tubes sont : 0,5 µg pour le dosage avec L. casei; 5 µg pour Str. faecalis et 2,5 µg pour Pediococcus. (Ces concentrations sont calculées en considérant les formes acides des folates et non pas les sels et uniquement leur forme L.).

	<u>L. casei</u>	<u>S. faecalis</u>	<u>P. cerevisiae</u>
5 - formyl - H ₄ -Pte glu	100	100	100
5 - méthyl - H ₄ Pte glu	89	4	5
H ₄ Pte glu	41	30	12
Pte glu	98	97	4
Témoin	9	3	4

TABLEAU II.

Croissance relative des souches par rapport aux composés foliques de références. Les résultats sont exprimés en % néph. par rapport au 5 formyl H₄ Pte glu (= 100 %).

Les résultats reportés dans ce tableau sont en accord avec les réponses qualitatives des souches représentées dans le tableau I, sauf pour l'acide tétrahydrofolique, qui donne des résultats très faibles. Nous pensons que cette anomalie est due à l'oxydation très rapide de ce composé sitôt qu'il est en contact avec l'oxygène. Les dilutions ont pourtant été préparées dans des solutions de mercaptoéthanol de façon à retarder cette oxydation, et le produit a été conservé sous vide, comme le conseille "Sigma".

3 - Séparation chromatographique :

Nous avons utilisé 2 types de chromatographie sur colonne : sur Séphadex G 25 et sur Diéthylaminoéthyl Cellulose (D.E.A.E. Cellulose).

- La filtration sur gel a déjà été utilisée pour l'isolement des ptéridines (DEWEY et KIDDER, 1967), et pour l'étude des composés foliques présents dans la rhizosphère du Colza (publication précédente) nous avons nous-même employé le Séphadex G 50. Cependant, pour les extraits de plantules, les folates étant plus divers, nous avons constaté une meilleure séparation avec le G 25. Nous avons donc finalement adopté ce type de Séphadex ("G 25 Fine", colonne de 2,5 x 40 cm) et l'élution s'effectue avec le tampon de MICHAELIS (PO₄H₂K - PO₄HNa₂) N/100, pH 7, en incorporant au moment de l'emploi 1 % d'ascorbate de sodium.

Précisons que pour les ptéridines, la séparation sur Séphadex n'est pas uniquement basée sur le poids moléculaire : certains groupements carboxyliques libres, présents dans le polymère, peuvent intervenir comme échangeur d'ions. De plus, on sait depuis longtemps qu'il existe une certaine affinité des Séphadex pour les composés aromatiques et hétérocycliques.

- La chromatographie sur D.E.A.E. Cellulose est la technique la plus classique pour la séparation des folates libres. Elle présente cependant un gros inconvénient pour les formes conjuguées car celles-ci ne sont éluées que par des tampons à molarité élevée, qui inhibent par la suite le développement des souches test utilisées pour la caractérisation des produits d'éluion.

Nous avons employé la D.E.A.E. Cellulose DE 11 (WHATMAN) en colonne de 1,8 x 15 cm, 120 fractions de 5 ml sont récoltées à chaque analyse. Les fractions 1 à 70 sont obtenues par passage sur la colonne d'un gradient linéaire d'un tampon phosphate de Na pH 6,5, de 0,010 M à 0,25 M, contenant, au moment de l'emploi, 1 ‰ d'ascorbate de Na. Les fractions 71 à 90 sont obtenues par le passage du même tampon phosphate, mais de molarité 0,30 M (+ 1 ‰ d'ascorbate). Enfin, les fractions 91 à 120 correspondent au passage de ce tampon à la molarité 0,50 M (1 ‰ d'ascorbate).

Pour l'extraction des composés foliques et leur analyse chromatographique, au lieu du 2 mercaptoéthanol, nous avons préféré utiliser l'ascorbate comme agent protecteur, afin d'éliminer la possibilité de la formation de complexes entre le tétrahydrofolate et le 2 mercaptoéthanol (ZAKREWSKI, 1966).

4 - Purification des solutions par adsorption sur charbon actif :

Après séparation chromatographique sur colonne des composés foliques provenant d'un extrait brut, il est souvent nécessaire d'éliminer les sels provenant du tampon d'éluion lorsque l'on désire ultérieurement faire un dosage quantitatif ou une nouvelle analyse chromatographique sur une autre colonne ou sur papier d'un composé particulier.

Dans ce but, nous avons adopté la technique d'adsorption sur charbon actif (MERCK) : les solutions, amenées à pH 3,0 (avec H_2SO_4) sont agitées avec le charbon pendant 30 mn à température ambiante, puis, après filtration le filtrat est repris et il subit la même opération. D'après DOCTOR et COUCH (1953), à pH 3,0, l'adsorption des folates s'effectue grâce à la présence des groupements aminés sur la molécule. Le charbon est ensuite recueilli et lavé avec l'éthanol à 50 %. L'éluion s'effectue avec un mélange d'alcool ammoniacal (éthanol : 25/ NH_4OH : 5/eau : 20) par agitation pendant 1 heure à 65 - 70°C. Cette opération est effectuée 2 fois, puis les filtrats sont concentrés sous vide et repris avec une solution d'ascorbate.

II - RESULTATS EXPERIMENTAUX.

1 - Dosage quantitatif des folates présents dans les plantules et leurs excréats :

Les composés foliques globaux des parties aériennes de plantules de Colza (variété Régina) âgées de 10 jours et des excréats correspondants ont été dosés à l'aide des 3 souches tests précédemment citées, et les résultats sont consignés dans le tableau III. Pour ce dosage, le liquide d'extraction des plantules et le produit d'éluion des tubes de culture ont été stérilisés par filtration.

	<u>L. casei</u>	<u>S. faecalis</u>	<u>P. cerevisiae</u>
Plantules (en $\mu g/mg$ P.F.)	0,620	0,390	0,075
Excréats (en $\mu g/plantule$)	0,810	0,430	0,038

TABLEAU III.

Teneurs en folates des plantules de Colza et des excréats correspondants.

Si nous considérons qu'une plantule pèse environ 80 à 100 mg après 10 jours de germination, nous pouvons déduire de ces résultats qu'après cette période, 0,015 % environ de sa teneur en folates (en tant que facteurs de croissance pour L. casei) sont retrouvés dans le substrat de germination.

2 - Comparaison des folates présents dans les plantules et leurs excréats après fractionnement sur colonne :

a) Fractionnement sur Séphadex G 25 :

Les résultats sont représentés sur la figure 1. Les produits de référence disponibles déposés sur la colonne ont été retrouvés dans les fractions 39 à 46 dans l'ordre suivant : 5 formyl H₄ Pte glu, 5 méthyl H₄ Pte glu, Pte glu, mais sans séparation très nette des pics d'éluion. Pour la séparation des folates du Colza, à partir de chaque fraction récoltée (5 ml) 0,5 ml sont testés avec L. casei, 2,5 ml avec Str. faecalis, et 2 ml avec P. cerevisiae. Ces volumes sont incorporés dans des tubes contenant 5 ml du milieu de culture (concentré 2 fois) correspondant à la souche, et après remplissage de chaque tube jusqu'à 10 ml avec de l'eau distillée, ceux-ci sont autoclavés 10 mn à 1 atm. L'inoculation s'effectue ensuite suivant les modalités habituelles.

Pour la lecture des résultats, le néphélomètre est réglé de façon à ce que le % néphélométrique donné par les 3 souches corresponde à des concentrations identiques de composés foliques (exprimées en 5 formyl H₄ Pte glu présents dans 1 ml de chaque fraction. Ce réglage est obtenu en amenant à un même % néphélométrique la densité turbidimétrique de chaque souche obtenue avec des concentrations témoins connues de 5 formyl H₄ Pte glu. Cette méthode donne ainsi des résultats permettant de comparer la stimulation relative de souches vis à vis d'un même folate, tout en évitant les calculs fastidieux nécessaires quand les concentrations doivent être rapportées quantitativement.

La filtration sur gel Séphadex des composés foliques présents dans les plantules permet de les séparer en 6 groupes représentés par les pics A à F (Fig. 1, graphique supérieur). Parmi ceux-ci, c'est le composé B, dont le maximum d'activité est situé dans la fraction 26, qui est dominant. De plus, d'après gel-filtration des produits de référence, nous pouvons dire que les pics E et F correspondent à des folates libres.

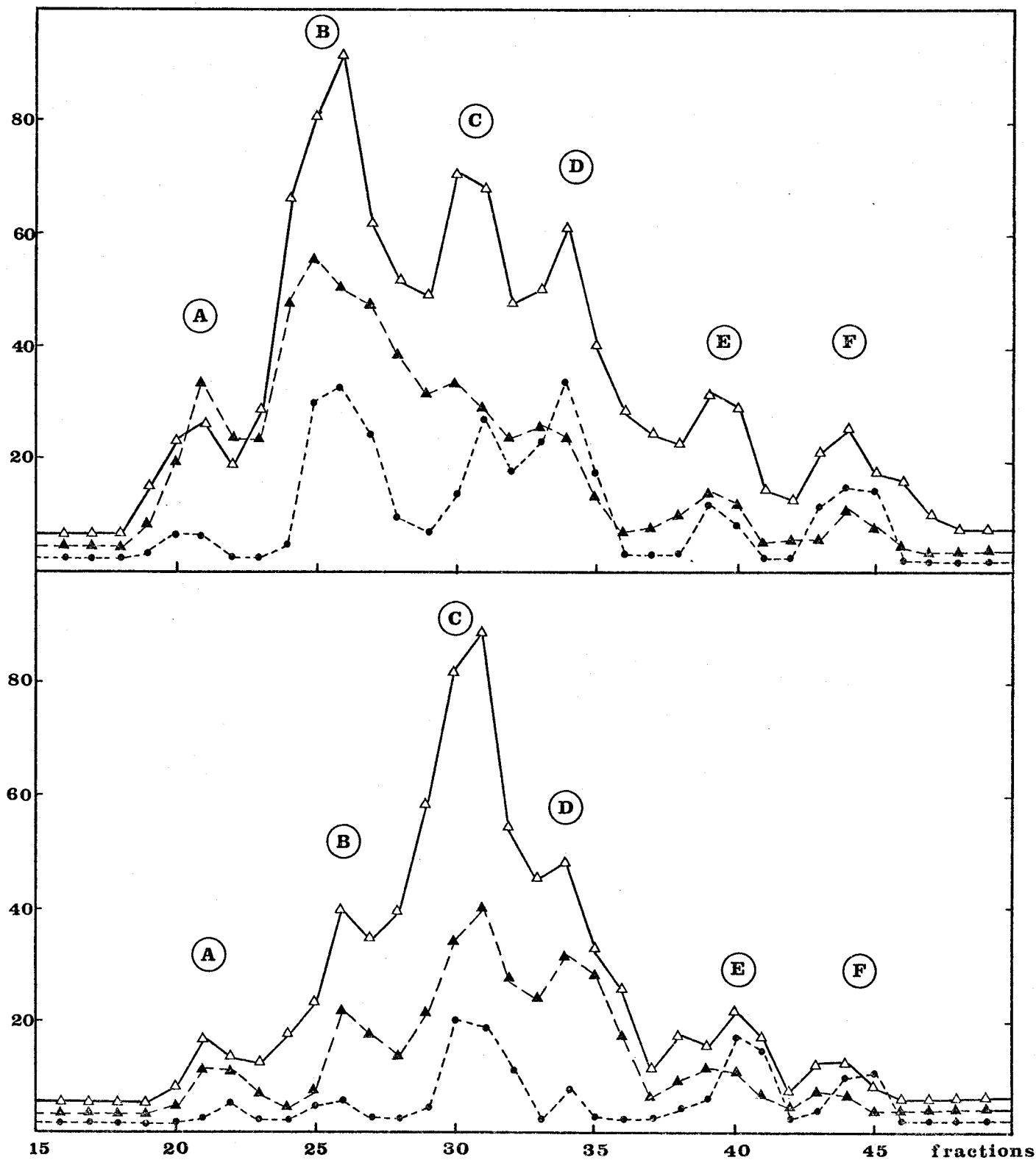


FIG. 1. FILTRATION SUR GEL SEPHADEX G 25

en haut : à partir de 0,5 g de plantules stériles de colza âgées de 10 jours.

en bas : à partir des excréments de 250 plantules stériles de colza âgées de 10 jours.

Les fractions (5ml) sont testées avec *L. casei* (Δ — Δ), *Str. faecalis* (\blacktriangle — \blacktriangle) et *P. cerevisiae* (\bullet — \bullet)

Colonne : 2,5 x 40 cm ; éluant : tampon de Michaelis 0,01 M pH 7 (+ 1 % ascorbate de Na) ; rythme d'éluion : 30 ml/heure.

A partir des excréats, si l'analyse est effectuée avec le produit d'élution de 100 plantules, pratiquement un seul pic, dont le maximum d'activité est situé dans la fraction 31, et qui correspond par conséquent au composé C, est apparent. Ce résultat avait déjà été obtenu avec le Séphadex G 50 (publication précédente, maximum d'activité dans la fraction 36), et nous savons que ce pic correspond à une forme conjuguée de l'acide folique.

Afin de retrouver la présence des autres folates dans les exsudats, nous avons alors effectué des fractionnements à partir des excréats de 250 plantules et le graphique inférieur de la fig. 1 montre que dans ce cas, nous avons une réponse des souches permettant de situer tous les pics.

En conclusion, cette étude sur Séphadex nous permet de constater une grande différence dans le spectre des folates présents dans les plantules et leurs exsudats : alors que dans les plantules, c'est le composé B qui est le plus abondant, dans les exsudats, c'est le composé C. Il faut aussi noter la faible concentration relative des folates libres dans les plantules (pics E et F) et pratiquement leur absence dans les excréats.

b) Fractionnement sur D.E.A.E. Cellulose :

Sur D.E.A.E. Cellulose, les folates sont mieux séparés, mais lorsque la molarité du tampon est de 0,25, la réponse des souches, dans nos conditions expérimentales, est inhibée par les sels et des adsorptions sur charbon sont nécessaires pour la caractérisation. La figure 2 présente les résultats obtenus avec les plantules et leurs excréats. Les modalités expérimentales employées pour la recherche des folates dans les fractions et pour la lecture des résultats sont identiques à celles que nous venons de préciser pour le fractionnement sur Séphadex. A partir des plantules, cette technique nous permet de caractériser au moins 6 pics majeurs et 2 pics mineurs. Dans les 60 premières fractions (graphique supérieur de la fig. 2) sont localisés 5 pics majeurs annotés I à V et les pics mineurs (fractions 10 et 20). Le composé VI, non représenté sur ce graphique, est élué dans les fractions 85 à 100, c'est à dire avec le tampon 0,30 M et 0,50 M. Ce composé est quantitativement le plus important. A partir des excréats (graphique inférieur de la fig. 2), on retrouve pratiquement plus les pics II et IV. Par contre, le composé VI est présent, et il donne encore la plus forte stimulation avec L. casei.

Identification des pics :

Pour cette identification, nous disposons de certains produits de synthèse (5 formyl H₄ Pte glu, 5 méthyl H₄ Pte glu, Pte glu), de la réponse relative des souches tests, et de quelques références bibliographiques. Pour la réponse des souches, en plus des données représentées sur les graphiques nous avons, à partir de chacun des pics localisés par L. casei pour une partie aliquote des fractions collectées, effectué des dosages quantitatifs après stérilisation sur filtre, afin d'éviter les altérations éventuelles des folates provoquées par autoclavage.

- Le folate I permet la croissance des 3 souches. De plus, il est le 1^{er} composé élué du D.E.A.E. Cellulose. Il pourrait donc représenter le 10 formyl H₄ Pte glu (NORONHA et coll. 1962, BIRD et coll. 1965, SOTOBAYASHI et coll. 1965, ROOS et coll. 1968). Mais ce composé, comme le 5 formyl H₄ Pte glu n'est pas présent dans les excréments. Il serait donc étonnant d'y trouver le 10 formyl d'autant plus que, dans la plantule, ce folate I est moins abondant que le 5 formyl. Pour cette raison, et aussi parce qu'il semble être élué trop tôt (fractions 5-6), nous ne pensons finalement pas qu'il puisse correspondre au 10 formyl H₄ Pte glu (Ce produit n'étant pas commercialisé, nous ne pouvons disposer de référence chromatographique). De plus, sa synthèse est assez délicate à effectuer. Aussi nous pensons que la seule technique qui pourra nous renseigner sur la nature de ce folate I consiste à essayer une isomérisation. Si ce folate est vraiment un 10 formyl H₄ Pte glu, il devrait donner le 5 formyl, pour qui nous connaissons les coordonnées chromatographiques.

Dans la littérature, nous avons trouvé un composé ayant les mêmes caractéristiques, et isolé à partir des feuilles de blé (ROHRINGER et coll. 1969). Les auteurs n'ont pu l'identifier de façon certaine, mais pensent qu'il puisse être une amide de l'acide formyl folique.

- Le folate II permet aussi la croissance de toutes les souches. Son ordre d'élué correspond au 5 formyl H₄ Pte glu de synthèse, l'un de nos produits de référence (fraction 24). Son identification ne pose donc aucun problème.

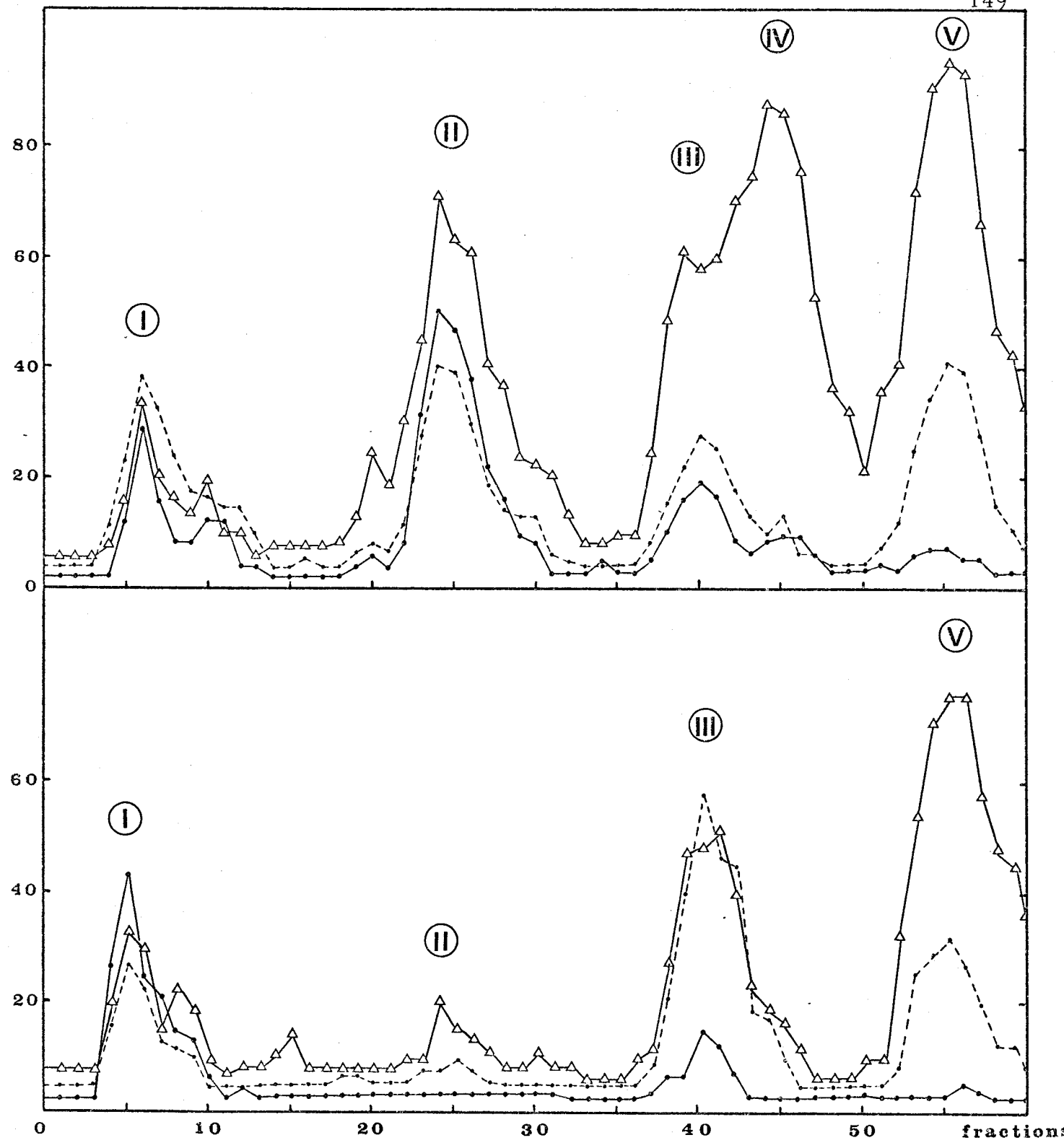


FIG. 2. CHROMATOGRAPHIE SUR DEAE CELLULOSE

en haut : à partir de 0,5 g de plantules stériles de colza âgées de 10 jours.
 en bas : à partir des excréments de 250 plantules stériles de colza âgées de 10 jours.

Les fractions (5ml) sont testées avec *L. casei* (Δ — Δ), *Str. faecalis* (- - - -)
 et *P. cerevisiae* (●—●).

Colonne : 1,8 x 15 cm ; éluant : tampon phosphate de Na (+ 1% . ascorbate de Na) pH 6,5,
 molarité : 0,010 \longrightarrow 0,25 pour les fractions 1 à 70 ; rythme d'éluion : 30 ml/heure.

- Le folate III donne une réponse assez faible avec P. cerevisiae. Il ne correspond à aucun composé de synthèse, mais il semble avoir les propriétés d'une forme diglutamique : le 10 (ou 5) formyl H_4 Pte glu₂ (BIRD et coll. 1965, ROHRINGER et coll. 1969).

- Le folate IV ne permet que la croissance de L. casei. Il correspond au 5 méthyl H_4 Pte glu, et son élution est identique à celle du dérivé synthétique (fractions 44-45).

- Le folate V est une forme conjuguée dont l'ordre d'élution et la réponse des souches permettent de l'assimiler au 5 méthyl H_4 Pte glu₂ (ou glu_n) ou au 5 formyl Pte glu_n (NORONHA et coll. 1962, ROHRINGER et coll. 1969).

- Enfin, le folate VI est un composé présentant probablement un taux de conjugaison élevé. Son élution est voisine de celle du Pte glu (fraction 89-90), mais il ne peut être assimilé à l'acide folique car, d'une part, il est sensible à l'action des conjugases, et d'autre part, il donnerait dans ce cas un profil tout à fait différent après fractionnement sur Séphadex puisque l'acide folique, en gel filtration, est élué très tard. Or, si nous passons sur colonne de Séphadex, le composé VI obtenu après fractionnement sur D.E.A.E. Cellulose, nous le retrouvons dans les fractions correspondant au pic C. Les pics C et VI contiennent donc le même composé folique.

- En ce qui concerne les pics mineurs, il est probable que le premier (fraction 10) corresponde au 10 formyl H_4 Pte glu. Le second n'est pas suffisamment net pour que l'on puisse interpréter ses coordonnées.

3 - Identification des folates hautement conjugués :

Cette étude a porté aussi bien sur les composés présents dans les excréments racinaires du Colza que sur les composés foliques des plantules elles-mêmes. Nous avons utilisé plusieurs préparations enzymatiques pour hydrolyser ces folates hautement conjugués : la carboxypeptidase A extraite du pancréas de bœuf et la γ glutamyl carboxypeptidase extraite du pancréas de poulet. Les résultats des hydrolyses enzymatiques sont étudiés à l'aide des 3 souches test habituelles, après séparations chromatographiques sur D.E.A. Cellulose ou sur Séphadex.

a) Utilisation de la carboxypeptidase A :

Cette carboxy peptidase n'est généralement pas employée pour l'étude des folates conjugués, mais étant donné la simplicité que présente son utilisation, puisqu'elle est fournie à l'état purifié (Sigma), et dans de brefs délais, ce qui n'est pas le cas pour les préparations pancréatiques de poulet, nous avons essayé de voir si les folates conjugués du Colza étaient sensibles à son action.

Pour cela, nous plaçons les extraits en incubation en présence de cette carboxypeptidase à pH 7,5, au bain marie 37°C pendant 30 heures, à l'obscurité et sous toluène. Après dénaturation de l'enzyme par chauffage, la réponse des souches test montre une forte stimulation de la croissance de Str. faecalis, aussi bien pour les excréats que pour les extraits de plantules. Ce résultat prouve qu'une action enzymatique a permis de libérer des formes foliques libres ou peu conjuguées, et l'analyse des produits d'hydrolyse en gel filtration confirme d'ailleurs cette action.

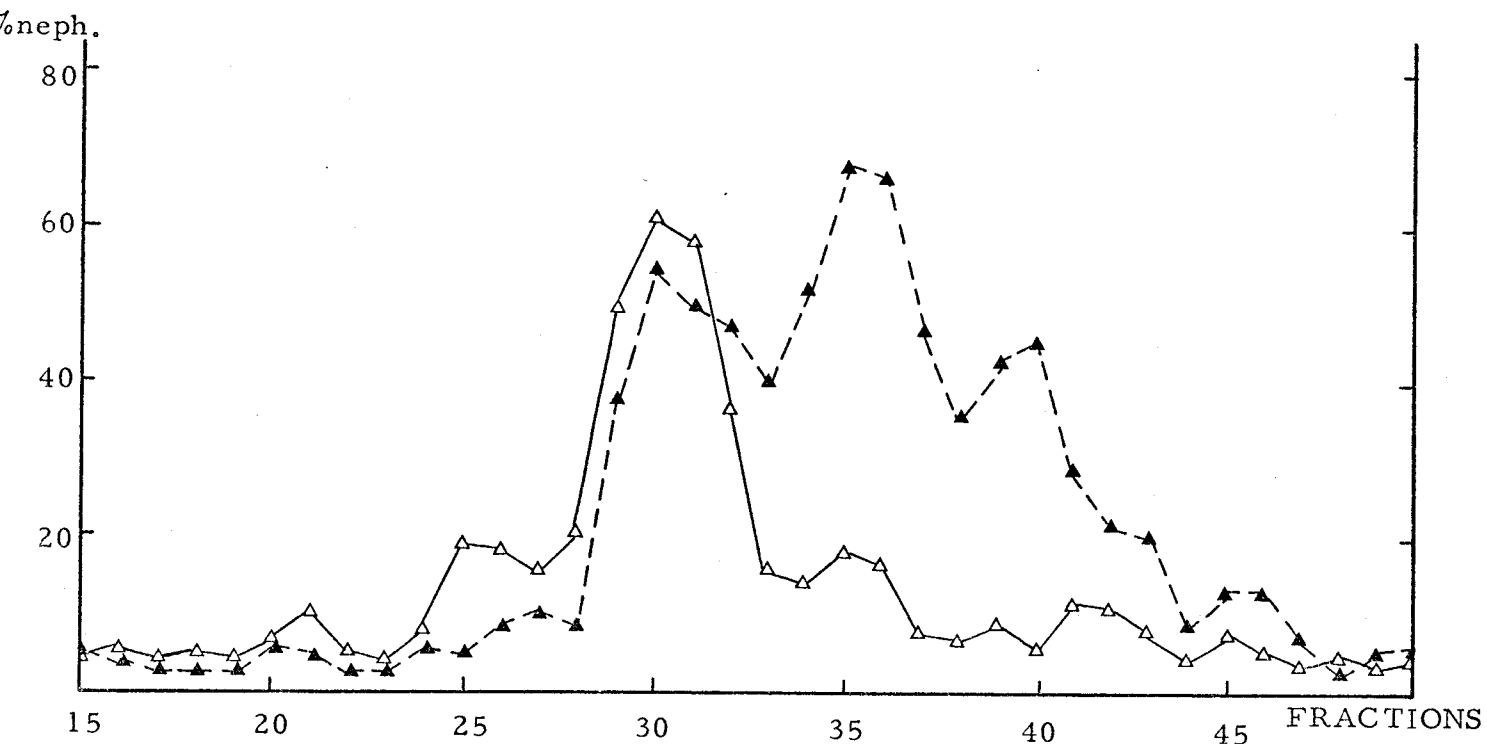


Fig. 3 : Gel - filtration sur Séphadex G25 des folates présents dans les excréments racinaires du Colza, avant (Δ — Δ) et après (\blacktriangle — \blacktriangle) incubation avec une carboxypeptidase A.

(dosages effectués avec L. casei - coordonnées chromatographiques identiques à celles de la fig. 1).

Ainsi, sur la figure 3, qui représente les composés foliques des excréments racinaires, avant et après action de la carboxypeptidase, analysés par gel filtration sur Séphadex G 25 ; nous constatons que le maximum d'activité folique, qui se situe dans les fractions 30 - 31 pour les excréments bruts, se déplace après action enzymatique et se situe alors dans les fractions 35 - 36 surtout.

Cependant, l'étude de ces produits d'hydrolyse sur colonne de D.E.A.E. Cellulose ne nous a jamais donné de bons résultats, probablement à cause de l'action incomplète de l'enzyme sur les folates.

b) Utilisation de la γ glutamyl carboxypeptidase pancréatique de poulet :

Cette enzyme est extraite de l'extrait pancréatique de poulet (Difco) suivant la technique de BIRD et coll. (1965), et nous savons que ses produits d'hydrolyse sont des formes diglutamiques.

Avant d'effectuer l'hydrolyse enzymatique, les extraits de plantules de Colza, ainsi que les excréments racinaires étudiés, sont initialement chromatographiés sur D.E.A.E. Cellulose suivant la technique précédemment décrite. Après vérification, à partir d'une partie aliquote de chaque fraction dosée avec L. casei, de la bonne séparation des folates, seules les fractions supérieures à 60 contenant les composés conjugués qui nous intéressent sont récupérées et rassemblées.

La solution obtenue est alors adsorbée sur charbon actif afin d'éliminer les sels, puis les folates sont repris par une solution d'ascorbate de Na à pH 7,8 et l'hydrolyse s'opère à 32°C sous toluène et à l'obscurité pendant 20 heures.

Après dénaturation de l'enzyme par chauffage, le produit d'hydrolyse est alors appliqué sur colonne de D.E.A.E. Cellulose et les 60 premières fractions de 5 ml éluées dans les mêmes conditions que précédemment sont analysées avec L. casei (0,5 ml), Str. faecalis (2,5ml) et P. cerevisiae (2 ml).

La figure 4, où seule la réponse de L. casei est représentée, donne le résultat de cette chromatographie effectuée à partir d'un extrait de plantules. Deux pics d'activité folique sont décelables : le premier, élué dans les fractions 36 à 40, correspond à un dérivé permettant aussi la croissance des deux autres souches test. Il semble donc présenter les propriétés du formyl H_4 Pte glu₂, dont nous avons déjà soupçonné la présence à l'état libre chez les plantules (composé III). Le second, élué dans les fractions 51 à 55, ne donne pas de réponse avec Str. faecalis et P. cerevisiae et correspond donc probablement au 5 méthyl H_4 Pte glu₂ (ROHRINGER et coll. 1969).

A partir des excréments racinaires, nous retrouvons, en adoptant ces mêmes modalités opératoires, des résultats identiques, mais avec une proportion beaucoup plus faible du composé formylé par rapport au composé méthylé.

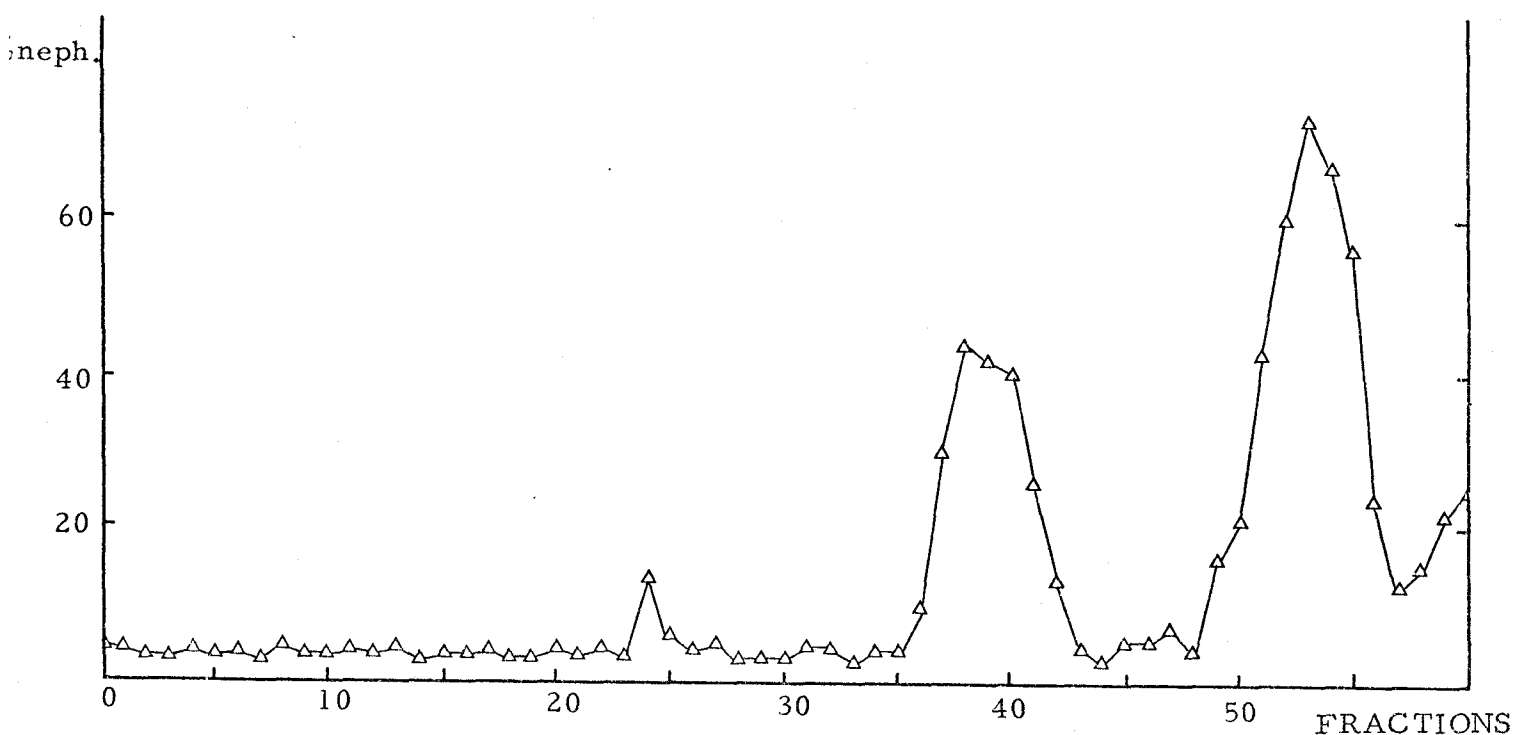


Fig. 4 : Chromatographie sur D.E.A.E. Cellulose des folates conjugués d'un extrait de plantules de Colza après action de la γ glutamyl carboxypeptidase.

(Réponse donnée par L. casei - coordonnées chromatographiques identiques à celle de la fig. 2).

En conclusion, nous pensons donc que les folates hautement conjugués du Colza seraient de deux types : des dérivés formylés et des dérivés méthylés. Signalons cependant que nous ne pouvons donner de résultats quantitatifs à partir de ces expériences car nous avons décelé dans la préparation enzymatique utilisée, des traces de formyl H_4 Pte glu_2 .

Pour donner une réponse définitive à ce problème posé par la nature et l'importance relative des folates conjugués chez le Colza, il sera donc nécessaire d'employer une technique de purification de la γ glutamyl carboxypeptidase plus élaborée, afin de la débarasser totalement des dérivés foliques. Il serait aussi intéressant de pouvoir étudier les produits d'hydrolyse donnés par la γ glutamyl carboxypeptidase de rein de porc qui conduit à la libération de monoglutamates, plus faciles à identifier (en particulier pour la caractérisation des formes formyl en position 5 ou 10).

III - DISCUSSION GENERALE DES RESULTATS ET CONCLUSION.

On connaît l'existence de formes conjuguées de l'acide folique non seulement chez les plantes, mais aussi chez les microorganismes et les animaux. Il semble même que ce soit dans le règne animal que l'on ait, pour la première fois, mis en évidence leur présence. Ainsi, des formes conjuguées du "Citrovorum factor" (5 méthyl H_4 Pte glu) ont été soupçonnées dès 1952 dans le foie de poulet (WIELAND et coll.) et en 1953 dans le foie de souris (DOCTOR et COUCH). Une étude plus précise, effectuée en 1962 par NORONHA et SILVERMAN sur les folates du foie de poulet, et en 1965 par BIRD et coll. sur les folates du foie de rat prouve que ces formes conjuguées sont quantitativement très importantes, et qu'il en existe plusieurs : non seulement des dérivés du 10 formyl et 5 formyl H_4 Pte glu contenant plusieurs résidus glutamiques, mais aussi des folates beaucoup plus complexes dérivés du 5 méthyl H_4 Pte glu. A partir du sang, on a pu d'ailleurs démontrer la présence de plusieurs folates conjugués du 5 méthyl H_4 Pte glu (NORONHA et ABOOBAKER, 1963). Enfin dans les "glandes à gaz" de Physalia physalis, WITTENBERG et coll. (1962) ont aussi isolé un dérivé polyglutamique après fractionnement sur D.E.A.E. Cellulose, mais n'ont pas pu le caractériser.

Chez les micro organismes, la synthèse de formes polyglutamiques de l'acide folique a été mis en évidence dans les cellules de plusieurs bactéries lactiques (HENDLIN et coll., 1953) et chez Neurospora crassa (SWENDSEID et NYC, 1958). Une forme triglutamique du 5 formyl H_4 Pte glu a été identifiée dans les cellules de Bacillus subtilis (HAKALA et WELCH, 1955), de Streptococcus faecalis (ZAKRZEWSKI et NICHOL, 1955) et des dérivés heptaglutamiques ont été trouvés chez Clostridium cylindrosporum (WRIGHT, 1955) et d'autres Clostridium (RABINOWITZ et HIMES, 1960). A partir de Cl. cylindrosporum, il est d'ailleurs intéressant de noter que WRIGHT isole, en plus des résidus glutamiques, de petites quantités d'autres acides animés tels que le glycoColle, la sérine et l'alanine. Enfin, soulignons l'importance des polyglutamates synthétisés par les microorganismes : SIROTNAK et coll. (1963) trouvent qu'ils constituent 85 à 90 % des folates présents dans les cellules de Diplococcus pneumoniae, SCHERTEL et coll. (1965) estiment que 97 % de l'activité folique des levures est due à des dérivés contenant plus de 3 résidus glutamiques.

Chez les plantes, la présence des formes conjuguées a été signalée, mais très peu de travaux se rapportent à ce sujet. Il est possible que ces composés ne soient pas synthétisés, d'une façon générale, par toutes les plantes puisque récemment encore, OGUNMODEDE et OYENUGA (1970), après des essais d'hydrolyse enzymatique effectués sur des extraits de Vigna unguiculata, ne trouvent pas de différence dans leurs dosages effectués simultanément avec L. casei et Str. faecalis, et en concluent que cette plante ne contient que des formes libres de folates. Ce résultat nous semble cependant improbable, et nous pensons plutôt à une inhibition des carboxypeptidases provoquée par l'extrait végétal car nous avons vu plus haut que les extraits enzymatiques de rein de porc, employés par ces auteurs, peuvent devenir inactifs en présence de certains inhibiteurs.

A notre connaissance, c'est NIELSEN et HOLMSTROM (1957) qui, à partir de pollen de diverses origines, ont été les premiers à signaler la présence de folates conjugués dans le règne végétal. Leur conclusion ne repose cependant que sur des expériences préliminaires ne mettant en oeuvre aucun fractionnement chromatographique. D'après ROHRINGER et coll. (1969), IWAI et NAKAGAWA auraient, en 1958, isolé à partir des feuilles de fève le 10 formyl H_4 Pte glu₃, mais n'ayant pu nous procurer cette publication, nous n'avons pas de précision sur ce travail.

Depuis 1958, il nous semble que seuls, ROHRINGER et coll. (1969), KIM (1970) et SENGUPTA et coll. (1971), dont les résultats viennent de nous parvenir, ont étudié ce problème des folates conjugués synthétisés par les végétaux. Les travaux de ROHRINGER et coll., se rapportant aux feuilles de blé, sont particulièrement intéressants car en plus des dérivés di et tri glutamiques du 10 formyl et 5 méthyl H_4 Pte glu, ils supposent avoir identifié un dérivé polyglutamique d'un tétrahydrofolate formylé qui est élué avant ou en même temps que le Pte glu sur D.E.A.E. Cellulose, et notent aussi la présence d'un autre folate présentant un taux élevé de conjugaison, mais qu'ils n'ont pu encore identifier. SENGUPTA et coll., à partir des racines de pois dont 52 % des ptéroylglutamates sont, d'après eux, des dérivés polyglutamyl, trouvent après traitement par la carboxypeptidase pancréatique de poulet, une libération importante de 5 méthyl H_4 Pte glu, qui constituerait la forme conjuguée dominante

chez le pois. Nos propres résultats concernant les plantules de Colza sont donc très proches des conclusions émises par ces auteurs.

Conclusion : Dans les excréments du Colza, la presque totalité des composés foliques se trouve sous forme conjuguée. Pourtant, dans les plantules, nous avons constaté l'existence de folates libres, mais ceux-ci étant à l'état réduit, il est probable qu'ils se dégradent très rapidement dans le substrat de germination et ne peuvent s'y accumuler. En présence d'une microflore, ces folates conjugués se modifient en libérant une forme libre de l'acide folique. Les bactéries rhizosphériques, ou tout au moins certaines d'entre elles, synthétisent donc des carboxypeptidases dont l'une des actions nous a ainsi été indirectement révélée en étudiant l'évolution de ces folates d'origine végétale dans la rhizosphère.

Il est probable que sous cette forme vitaminique non conjuguée, les folates pourront être utilisés par certains microorganismes à pouvoir de synthèse faible. Etant donné la complexité des microflores totales employées dans ces expériences, il serait très difficile de vérifier d'une façon systématique cette hypothèse, mais ce phénomène est très certainement un nouvel exemple qui, s'ajoutant à beaucoup d'autres souvent mieux connus, permet d'expliquer l'équilibre biologique de la microflore tellurique.

5^e PARTIE

ETUDE PARTICULIERE

DE LA PRODUCTION D'UNE SUBSTANCE

DE TYPE CYTOKININE

PAR DES ARTHROBACTER

Ce dernier chapitre est relatif à la production par les bactéries rhizosphériques, d'une substance de type phyto hormonal : une cytokinine. Les effets de cette kinine sur le système racinaire du Colza nous ont permis de détecter sa présence dans la rhizosphère, puis de la mettre en évidence dans les milieux de culture des souches bactériennes pures. Cette action sur les racines des plantules est très nette en culture hydroponique, lorsque certaines microflores telluriques, ou lorsque certaines souches d'Arthrobacter sont inoculées dans les tubes à germination. La dichotomie du système racinaire est alors très prononcée par rapport aux germinations stériles, et un manchon très dense de poils absorbants apparaît autour des racines, dont la longueur diminue corrélativement (schéma I).

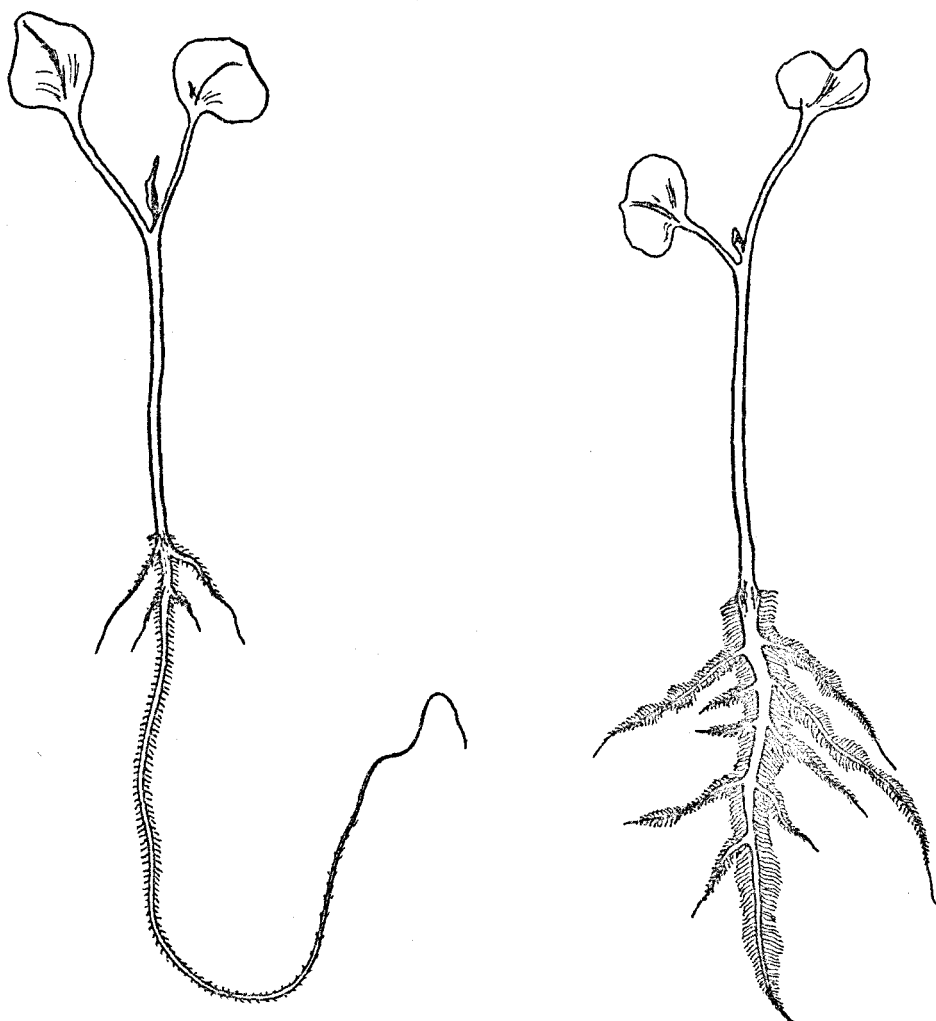


Schéma I. Aspect de plantules de Colza provenant d'une culture stérile (à gauche) et d'une culture effectuée en présence d'un Arthrobacter (à droite).

Nous étudierons successivement la mise en évidence de la production de cette cytokinine dans la rhizosphère du Colza par certains Arthrobacter, puis sa purification à partir des milieux de culture bactérien et sa nature chimique.

A - PRODUCTION D'UNE SUBSTANCE DE TYPE CYTOKININE PAR DES ARTHROBACTER D'ORIGINE RHIZOSPHERIQUE.

Ces recherches ont été publiées dans les Comptes Rendus (1970 - 270)

MICROBIOLOGIE DU SOL. — *Production d'une substance de type cytokinine par des Arthrobacter d'origine rhizosphérique*. Note (*) de M. Roland Blondeau, présentée par M. Roger Heim.

Une phytohormone provoquant la prolifération de poils absorbants sur le système racinaire des plantules de colza a été isolée à partir de cultures d'*Arthrobacter*. Cette substance présente une activité de type cytokinine.

Lorsque des plantules de colza (var. crésus) se développent en culture hydroponique, l'aspect du système racinaire diffère suivant que la culture est effectuée en milieu stérile, ou en présence d'une microflore tellurique. En culture stérile, les racines, toujours très longues et grêles, sont peu dichotomisées. En présence d'une microflore tellurique, apportée par une suspension de terre inoculée au milieu de culture, les racines présentent au contraire une importante dichotomie ; elles sont plus courtes et entourées de poils absorbants beaucoup plus nombreux et plus longs.

La fréquence d'apparition et l'intensité de ce phénomène dépendent de la nature et de l'origine de l'apport tellurique. Cependant, la stérilisation de celui-ci supprime en même temps cette rhizomorphogenèse.

Après avoir identifié les microorganismes responsables de cette action, nous nous sommes proposé d'isoler à partir de leurs filtrats de culture une substance, retenue sur résine échangeuse de cations, qui reproduit le même phénomène sur le colza. Celle-ci permet en outre la prolifération du tissu médullaire de tabac, utilisé en tant que test caractéristique des cytokinines.

I. ISOLEMENT DES MICROORGANISMES ET IDENTIFICATION. — Deux méthodes ont été utilisées simultanément :

La première consiste à cultiver stérilement des graines de colza (variété crésus) en culture hydroponique, avec la solution nutritive de Knop diluée au demi, dans des tubes de 25 × 200 mm présentant des alvéoles internes au tiers inférieur de la hauteur, permettant ainsi la germination sur un support en coton hydrophile disposé au-dessus de la solution minérale. Après quelques jours de germination à 18 °C avec une alternance de 12 h de lumière et d'obscurité, des suspensions dilution au 1/1 000^e, 1/10 000^e et 1/100 000^e d'une terre choisie sont réparties à raison de 1 ml par tube. Dix jours après cet apport, on sélectionne les tubes présentant une activité pilifère particulière. Les milieux de culture correspondant aux dilutions les plus élevées de microflore tellurique sont étalés sur milieu gélosé de Bunt et Rovira (1) et mis en incubation à 28 °C. Au bout de 5 jours, on isole une souche bactérienne à partir de chaque flore dominante observée. L'action de chacune de ces souches pures sur les racines est enfin éprouvée par inoculation à des cultures stériles de colza obtenues suivant la même technique, et seules les souches reproduisant le phénomène étudié sont conservées.

En employant la seconde méthode, on ne sélectionne plus, au départ, de semis présentant un aspect particulier : les graines sont ensemencées suivant une technique

(2)

déjà décrite (2) dans des tubes contenant comme substrat de germination du sable. La microflore tellurique est toujours apportée par une suspension dilution de terre, et après 10 jours de culture, la microflore rhizosphérique est étalée sur milieu de Bunt et Rovira. Chaque colonie est ensuite isolée, puis inoculée à des cultures stériles de colza comme précédemment.

Nous avons pu ainsi sélectionner, en employant la première méthode, 4 souches bactériennes pures, à partir de 5 terres différentes, et avec la seconde méthode, 24, à partir de 3 terres différentes.

Ces 28 souches ont été finalement identifiées. Toutes sont des Corynébactéries du genre *Arthrobacter*.

TABLEAU I

Caractéristiques du système racinaire des plantules de colza cultivées en culture hydroponique dans différentes conditions expérimentales

Conditions expérimentales	Lecture effectuée après 6 jours de culture, souche bactérienne utilisée : C 13			
	Longueur des racines (cm)	Diamètre des racines au 1/3 inférieur de la longueur (mm)	Diamètre du man- chon de poils absor- bants entourant les racines à la même hauteur (mm)	Hauteur moyenne de la tige (cm)
Témoin = solution de Knop	7,5	0,6	1,4	4
+ inoculum bactérien (*)	1 ml 1,6	1,1	4,2	4
	0,1 ml 1,8	1,1	4	4
+ filtrat de culture (**)	0,5 ml 2,6	1	3,8	4
	1 ml 1,4	1,1	4	4
+ filtrat de culture (**) retenu sur « Dowex 50 »	0,5 ml 5,8	0,8	3,2	4
	1 ml 2,3	1,1	3,3	4

(*) Les *Arthrobacter* sont prélevés quand les cultures sont en phase exponentielle de croissance. Après 2 lavages successifs dans un liquide isotonique, ils sont dilués de façon à obtenir le même volume initial.

(**) Après concentration au 1/4 du volume initial.

II. ISOLEMENT D'UNE CYTOKININE A PARTIR DES MILIEUX DE CULTURE DES ARTHROBACTER. — Le tableau I donne les caractéristiques du système racinaire du colza cultivé en présence de bactéries ou de leurs filtrats de culture. La composition des milieux employés a déjà été signalée (3). Afin d'obtenir un taux de croissance plus élevé, les cultures s'effectuent toujours en agitation, à 28 °C, et 4 ‰ de « Casamino acid » (DIFCO) sont ajoutés au milieu minéral glucosé.

Des essais préliminaires ayant montré que l'activité des milieux vis-à-vis des racines de colza était proportionnelle au temps d'incubation jusqu'à un optimum correspondant à 65 h de culture, les fractionnements sont toujours effectués au terme de ce temps.

Si, après centrifugation, ces milieux de culture sont passés sur résine « Dowex 50 X 8 » (forme H⁺), on retrouve une activité pilifère dans la fraction retenue sur la résine et éluée par une solution ammoniacale (tableau I). Après concentration,

(3)

celle-ci est alors déposée sur colonne de « Séphadex G 25 » (20-80 μ) éluée par le tampon phosphate de Michaelis N/100 à pH 7,0. En incorporant les fractions de 5 ml collectées à des tubes de culture ensemencés de colza, on retrouve la substance active dans les fractions 32 à 35, absorbant fortement la lumière ultraviolette à 2 537 Å (*fig. a*). Une chromatographie sur papier, effectuée à partir de ces fractions, permet de mettre en évidence la présence de 2 substances facilement repérables à la lumière de Wood. Celles-ci sont alors séparées par chromatographie des fractions 32 à 35, préalablement concentrées, sur colonne de CM « Séphadex C 50 » éluée avec un tampon phosphate-borax à pH 6,0. Le deuxième pic d'absorption en lumière ultraviolette obtenu après cette chromatographie correspond à la substance active sur les racines (*fig. b*). Celle-ci est finalement déminéralisée par passage sur résines et lyophilisée.

En incorporant cette substance purifiée au milieu de Murashige et Skoog (⁴) dépourvu de kinétine, elle permet la prolifération de la moelle de tabac (variété Wisconsin 38). Cette substance est donc une phytohormone du type cytokinine.

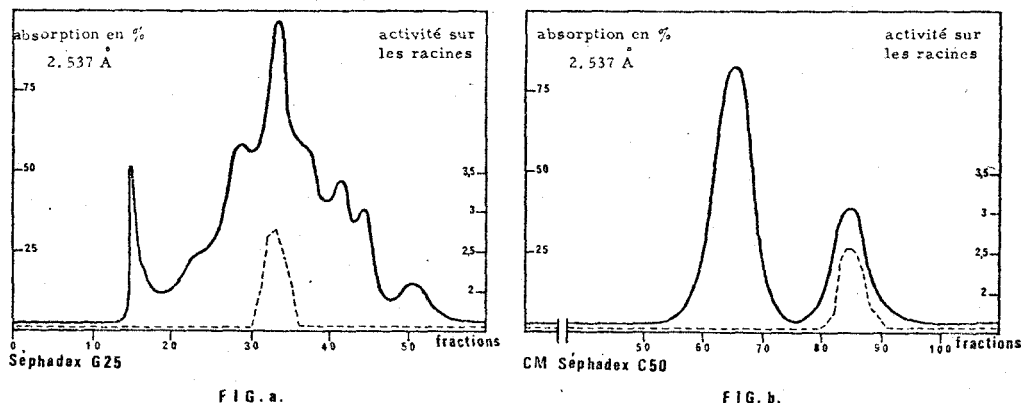


Fig. a. — Gel filtration de la fraction retenue sur Dowex, sur colonne de « Séphadex G 25 » (2,5 × 40 cm) ; rythme d'élution : 30 ml/h ; volume des fractions : 5 ml.

Fig. b. — Chromatographie des fractions 32 à 35, obtenues après plusieurs gel filtrations, sur colonne de CM « Séphadex C 50 » (3 × 60 cm) ; rythme d'élution : 20 ml/h ; volume des fractions : 5 ml.

— absorption à 2 537 Å ;

- - - diamètre, en millimètres, du manchon pilifère des racines de colza.

III. DISCUSSION ET CONCLUSION. — La kinétine (6-furfuryl amino purine), introduite à une concentration finale de 10^{-6} ou 10^{-7} g/ml à des cultures de graines de colza provoque une morphogenèse semblable à celle qui est induite par les *Arthrobacter*.

Par contre, les R_f obtenus par chromatographie sur papier à partir de la cytokinine isolée des cultures d'*Arthrobacter* (tableau II) après révélation suivant la méthode de Michl caractérisant les dérivés puriques par formation de complexes mercuriques colorés par l'éosine (⁵) ne correspondent pas à la kinétine (R_f : 0,72 avec le système N butanol/ NH_4OH 4/1).

Cette cytokinine n'est pas non plus la 6-(γ,γ -diméthyl-allyl-amino) purine, isolée à partir de *Corynebacterium fascians* [(⁶), (⁷)], d'*Agrobacterium tumefaciens* [(⁸), (⁹)]

(4)

TABLEAU II

Chromatographie sur papier de la cytokinine isolée
(développement à 25 °C sur papier « Whatman n° 3 »)

Eluant	Eau pH 8 (avec NaOH)	N butanol/ac. formique/eau 80/15/15	N butanol/NH ₄ OH 4/1
Type de chromatographie.	ascendante	descendante	descendante
R _f adénine (*)	0,38	0,34	0,22
R _f cytokinine	0,85	0,53	0,27

(*) L'adénine est utilisée comme référence.

et de *Rhizobium leguminosarum* ⁽¹⁰⁾ (R_f = 0,81 avec le système N butanol/acide formique/eau 80/15/15).

Enfin, elle est différente aussi de la cytokinine non identifiée, synthétisée par *Streptomyces flaveolus* ⁽¹¹⁾ (R_f = 0,91 avec le système N butanol/NH₄OH 4/1).

A notre connaissance, cette phytohormone n'aurait donc jamais été isolée à partir de cultures bactériennes. Nous essayons actuellement de déterminer sa structure chimique.

(*) Séance du 1^{er} juin 1970.

(1) J. S. BUNT et A. D. ROVIRA, *J. Soil Sc.*, 6, 1955, p. 119.

(2) R. BLONDEAU, *Bull. Soc. Bot. Nord Fr.*, 21, 1968, p. 99.

(3) R. BLONDEAU, *Ann. Inst. Pasteur*, Lille, 21, 1970, p. 295.

(4) T. MURASHIGE et F. SKOOG, *Physiol. Plantarum*, 15, 1962, p. 473.

(5) H. MICHL, *Naturwiss.*, 40, 1953, p. 390.

(6) D. KLÄMBT, G. THIES et F. SKOOG, *Proc. Nat. Acad. Sc.*, 56, 1966, p. 52.

(7) J. P. HELGESON et N. J. LEONARD, *Proc. Nat. Acad. Sc.*, 56, 1966, p. 60.

(8) D. KLÄMBT, *Wissensch. Z. Univ.*, Rostock, 16, 1967, p. 623.

(9) I. ROMANOW, M. A. CHALVIGNAC et J. POCHON, *Ann. Inst. Pasteur*, Paris, 117, 1969, p. 58.

(10) M. GIANNATTASIO et S. COPPOLA, *Giorn. Bot. Ital.*, 103, 1969, p. 11.

(11) S. COPPOLA et M. GIANNATTASIO, *Bull. Soc. Ital. Biol. sper.*, 44, 1968, p. 1913.

(Laboratoire de Cryptogamie, Faculté des Sciences,
B. P. n° 36, 59-Lille, Nord.)

Une action particulière d'un produit du métabolisme bactérien sur la morphologie du système racinaire des plantes a déjà été signalée par un certain nombre de chercheurs employant soit des microflores telluriques "totales" (ROVIRA et BOWEN 1960, BOWEN et ROVIRA 1961, WELTE et TROLLDENIER 1963), soit des souches pures (POCHON et BARJAC 1958, FALLOT et coll. 1966 et 1970). Le phénomène observé est en général un raccourcissement des racines suivi de l'augmentation de leurs ramifications. Certains notent cependant que l'aspect de ce système racinaire dépend surtout de la concentration du facteur phytohormonal en cause, ou de la nature de la plante.

Pour POCHON et BARJAC, la substance responsable de la morphologie particulière des racines de maïs produite par les filtrats de culture d'Azotobacter chroococcum serait du type auxinique, alors que pour FALLOT et coll. qui ont étudié la croissance des plantules de radis en présence de filtrats de Bacillus megaterium ou de Pseudomonas fluorescens, elle serait de type purique. Il est pourtant intéressant de préciser que ce facteur purique isolé par FALLOT est soluble, sans hydrolyse initiale, dans l'acétate d'éthyle (FALLOT et coll. 1966), ce qui n'est pas le cas pour la cytokinine extraite des cultures d'Arthrobacter.

Cependant, la prolifération très active des poils racinaires, qui constitue la caractéristique principale de nos cultures de Colza quand elles sont en présence de cytokinine, est probablement spécifique à cette plante car les auteurs cités ci-dessus n'insistent jamais sur cet aspect morphologique. Dans certaines germinations stériles, en conditions hydroponiques, nous avons d'ailleurs déjà remarqué sur les racines, une réaction identique à celle qui est induite par les Arthrobacter, mais toujours très localisée, sur une distance de quelques millimètres seulement, et sans influence sur leur longueur. Nous pensons que cette action, toujours de type phytohormonal, est provoquée par la présence de cytokinine d'origine végétale dans le milieu de culture du Colza. Les travaux de KENDE (1965), ITAI et VAADIA (1965), SKENE et KERRIDGE (1967) KLAMBT (1968) et YOSHIDA et coll. (1970 et 1971), relatifs à l'excrétion de substances de type cytokinine par le système racinaire des plantes, appuient cette hypothèse.

Sur le plan strictement biochimique, après avoir purifié la cytokinine produite par l'Arthrobacter C'13, nous en avons conclu qu'elle était différente des cytokinines actuellement connues et produites dans des milieux de culture bactériens (publication précédente). Nous pouvons ajouter qu'à notre connaissance, aucune autre kinine n'a été isolée et caractérisée à partir d'une culture d'Eu-bactérie non pathogène ou non symbiotique. En effet, la production de telles substances a tout d'abord été signalée chez Corynebacterium fascians (THIMAN et SACHS 1966, HELGESON et LEONARD 1966), Agrobacterium tumefaciens (KLAMBT 1967, ROMANOV et coll. 1969, UPPER et coll. 1970), toutes deux pathogènes des plantes, puis chez Rhizobium leguminosarum (GIANNATTASIO et COPPOLA 1969) et Rh. japonicum (PHILLIPS et TORREY 1970), toutes deux symbiotiques des légumineuses. Par contre une actinomycétale : Streptomyces flaveolus (COPPOLA et GIANNATTASIO, 1968), un champignon mycorhizien : Rhizopogon roseolus (MULLER, 1967) et des champignons phytopathogènes : Uromyces phaseoli, U. fabae (KIRALY et coll., 1966) et Nectria galligena (BARTHE, 1971) produiraient aussi des substances à activité cytokinique.

La nature chimique des phytohormones synthétisées a été déterminée pour Corynebacterium, Agrobacterium et Rhizobium : c'est une 6 - (δ , δ , - dimethyl-allyl-amino) - purine, et pour Rhizopogon : c'est une zeatine et son riboside. Nous savons que les caractéristiques chromatographiques de ces substances sont différentes de celles du produit synthétisé par les Arthrobacter. Nous avons pu aussi vérifier que les caractères de solubilité dans les solvants organiques ne correspondent pas, ainsi que les spectres d'absorption dans les U.V., comme nous le verrons plus loin.

B - ETUDE DE LA NATURE CHIMIQUE DE LA CYTOKININE SYNTHETISEE
PAR LES ARTHROBACTER.

Pour étudier la nature chimique de cette cytokinine, il nous fallait tout d'abord mettre au point une méthode permettant l'obtention de quantités suffisamment importantes de substance phytohormonale pour en faire l'analyse. Or, la souche C'13 employée précédemment présente un inconvénient car pour obtenir un taux de croissance convenable, elle exige la présence d'acides aminés dans le milieu de culture, et lors de l'extraction de la cytokinine, ceux-ci nous obligent à utiliser des volumes de résines et surtout de Séphadex G 25 importants.

Afin de pouvoir mettre en incubation de gros volumes de milieu de culture sans avoir ensuite ces inconvénients, nous avons ainsi sélectionné une nouvelle souche d'Arthrobacter et modifié corrélativement la technique de purification de la cytokinine.

1 - Mise au point d'une nouvelle méthode d'isolement et de purification de la cytokinine à partir des milieux de culture :

a) Choix de la souche :

A partir de notre collection de souches, parmi les Arthrobacter produisant des substances à activité cytokinine, décelables par leur action sur la rhizomorphogénèse du Colza, nous avons retenu la souche C 103 qui, après plusieurs repiquages sur le milieu minéral de Lochhead additionné de glucose, donne un taux de croissance assez élevé, permettant l'obtention de cultures suffisamment denses.

La fiche signalétique de cette souche C 103 est résumée ci-dessous

catalase	+
cytochrome oxydase	+
type respiratoire	aérobie strict.
t° optimum de croissance	26°C
mobilité	0
pigmentation	0
action sur le glucose	oxydation lente
utilisation des citrates	+
production d'acétylméthylcarbinol	0
production d'indole	0
production de H ₂ S	0
réduction des nitrates en nitrites	+
production d'amylase	+
production d'urease	0
production de gélatinase	+
synthèse d'ac.β indolylacétique	+
croissance sur N. minéral	+

Pour l'analyse des critères physiologiques et biochimiques considérés dans cette fiche signalétique, les techniques utilisées ont été précisées dans la 2ème partie de ce mémoire. En se rapportant au "Bergey's Manual of Determinative Bacteriology", cette souche serait très proche d'A. globiformis caractérisée par l'absence de pigmentation et de croissance à 37°C, la présence d'une amylase, et l'utilisation des citrates comme seule source de carbone.

b) Culture :

La solution minérale de Lochhead est préparée dans des ballons de 6 litres, à raison de 2,5 litres par ballon, et la stérilisation s'effectue par autoclavage à 1 atm. pendant 20 mn. Le glucose (NBC), stérilisé séparément à 0,5 atm., est incorporé ensuite au milieu à raison de 4g/l. Chaque expérience est effectuée à partir de 5 l. de milieu. Les inoculum sont constitués, pour chaque ballon, par 50 ml d'une culture prélevée en phase exponentielle de croissance de la souche préalablement incubée dans le milieu minéral glucosé précédent. Ces ballons sont finalement portés à 26°C pendant 72 heures en agitation continue (90 cycles/mn - agitateur rotatif Biolafitte).

c) Fractionnement des milieux :

Après incubation, les 5 l. de culture sont centrifugés à 12.000 g. et le surnageant récupéré, concentré jusqu'à environ 50 ml, est passé sur résine Dowex 50 W x 2, 100 - 200 mesh. (Fluka), utilisée sous forme H^+ . Après éluat de cette résine avec une solution ammoniacale N. et concentration à sec de l'éluat, celui-ci, repris avec 2 ml d'eau distillée, est déposé sur colonne de CM Séphadex C 50, éluee avec le tampon phosphate - borax à pH 6,0. La figure 1 donne le profil de l'éluat des substances absorbant les U. V. à 2537 Å.

D'après le fractionnement effectué précédemment avec la souche C'13 (page 162), nous savons que les fractions 78 à 89, correspondant au dernier pic enregistré, contiennent la cytokinine. Ces fractions sont donc reprises, concentrées, et par gel filtration sur Séphadex G 15, on élimine les sels du tampon provenant de la chromatographie précédente tout en purifiant la cytokinine. La figure 2 représente, d'une part, cette élimination des sels mise en évidence par la recherche des phosphates dans chaque tube collecté avec le réactif nitrovanadomolybdique, et d'autre part la séparation des substances ab-

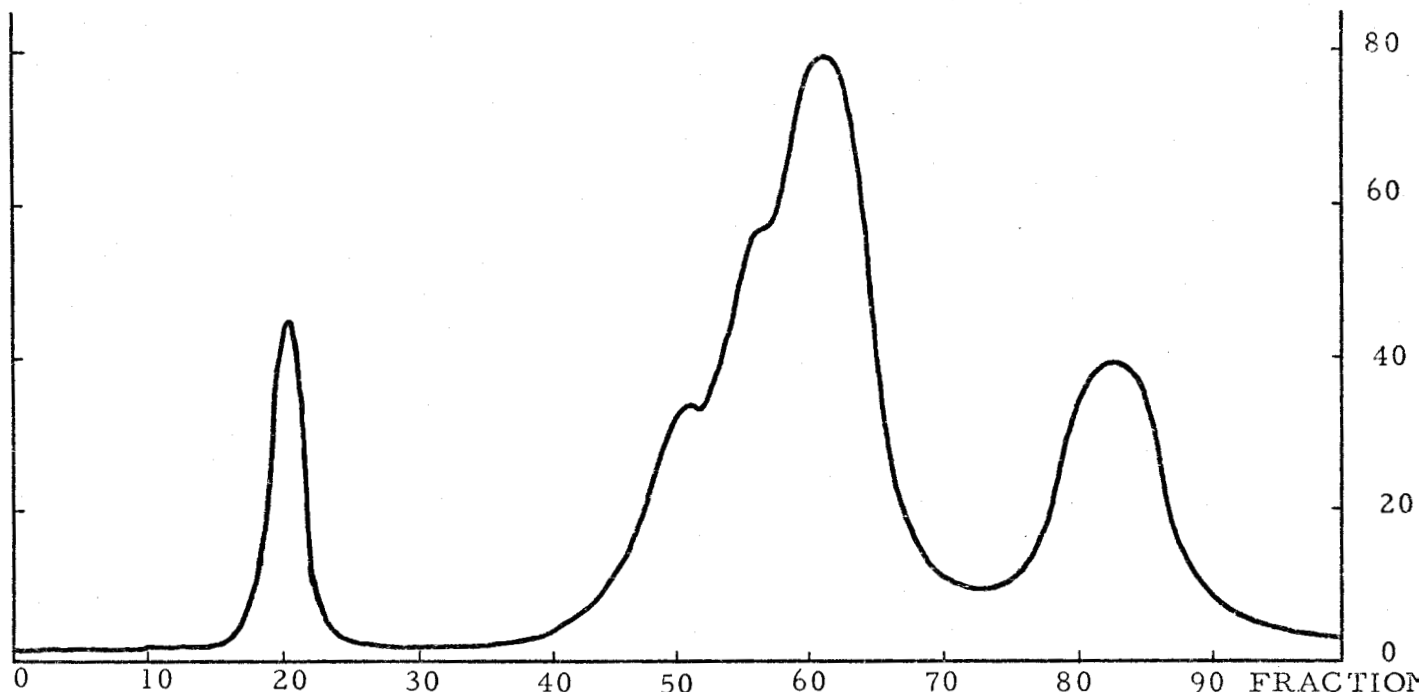


FIG. 1 - Chromatographie sur C M Sephadex C 50 d'un milieu de culture dépourvu d'N. organique, après incubation d'une souche d'*Arthrobacter* (fraction retenue sur Dowex). Colonne : 3 x 60 cm ; éluant : tampon phosphate-borax 0,1 M, pH 6,0 ; rythme d'élu-tion : 20 ml/h ; volume des fractions : 5 ml.

PHOSPHATES
D.O. à 4050 Å

Absorption en %
2537 Å

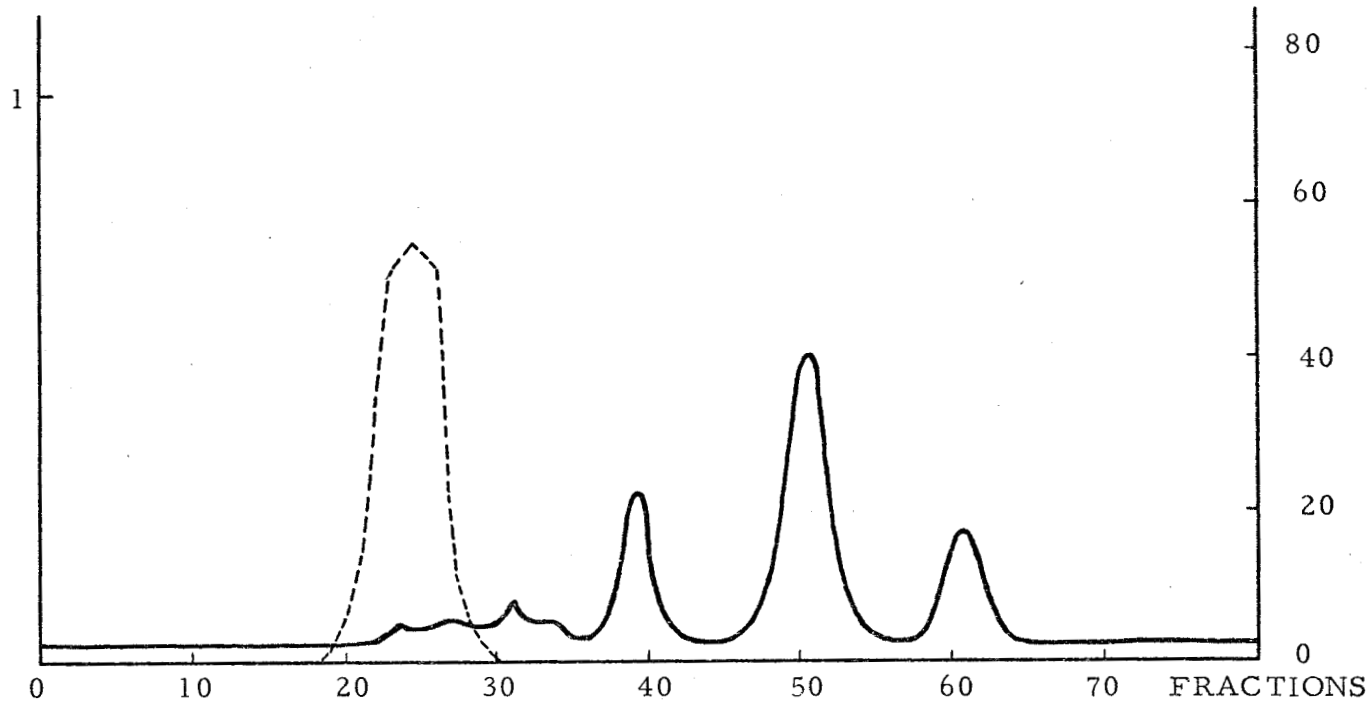


FIG. 2 - Gel filtration des fractions 78 à 89 correspondant à la chromatographie représentée sur la fig. 1, sur Sephadex G 15 — Colonne : 2,5 x 40 cm ; éluant : eau dis-tillée ; rythme d'élu-tion : 20 ml/h ; volume des fractions : 5 ml.

En trait plein : absorption à 2537 Å ; en trait discontinu : D.O. obtenue à 4050 Å après réaction d'une partie aliquote des fractions avec le réactif nitrovanadomolybdique.

absorbant les U.V. en 3 fractions distinctes.

Parmi ces 3 fractions, l'analyse de leur spectre U.V. et leur activité sur la moëlle de tabac permet de reconnaître la cytokinine. En effet, nous savions que la phytohormone isolée à partir de la souche C'13 suivant la technique précédente présente un spectre d'absorption aux rayons U.V. avec une longueur d'onde d'absorption maximum située entre 253 et 254 m μ . Or, le spectre U.V. effectué à partir des 3 substances séparées sur Séphadex G 15 (figure 3) donne respectivement pour la substance présente dans la fraction 39 : λ max. 257 m μ , pour la substance présente dans la fraction 51 : λ max. 253 m μ , et pour la substance présente dans la fraction 61 : λ max. 268 m μ . Notre cytokinine correspond donc à la 2ème substance enregistrée après gel filtration.

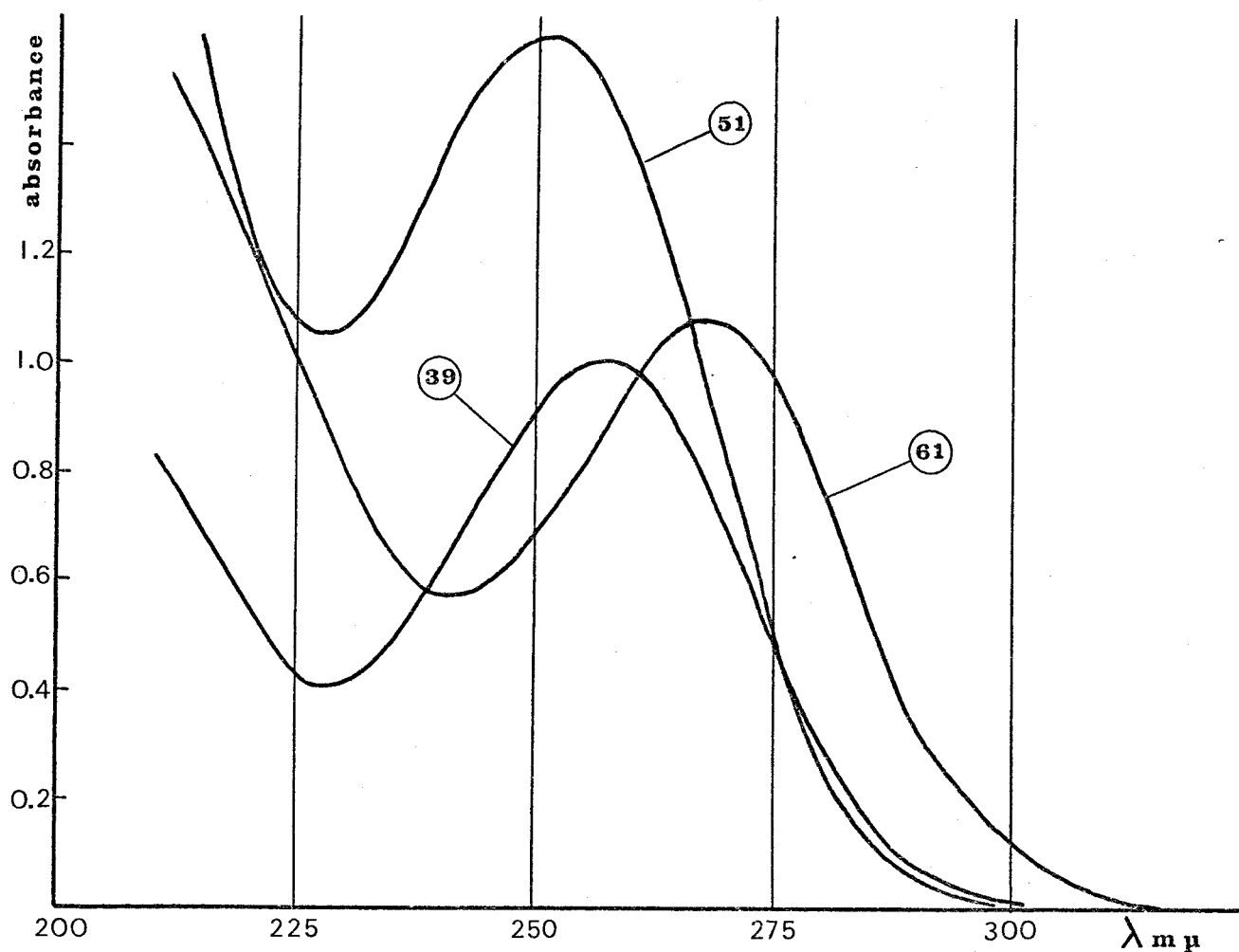


Fig. 3 : Spectre U.V. des fractions 39, 51 et 61, séparées par gel filtration sur Séphadex G 15 (Spectrophotomètre Unicam SP 800)

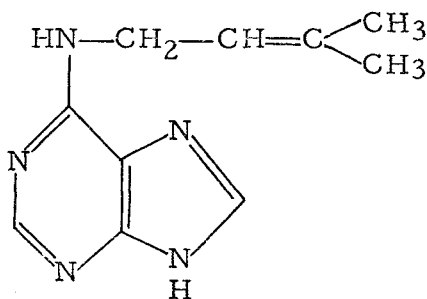
Le test "Cytokinine" effectué avec la moëlle de tabac, confirme cette identité : en incorporant cette substance au milieu de Murashige et Skoog dépourvu de kinétine, le parenchyme medullaire du tabac (*Nicotiana tabacum* W. 38), prélevé sur des tiges adultes après élimination des extrémités apicales et basales (*) est en effet capable de proliférer, prouvant ainsi l'activité phytohormonale de cette substance.

Enfin, après gel filtration sur Séphadex, la cytokinine est éventuellement chromatographiée sur papier Whatman n°1 en chromatographie descendante avec comme éluant le mélange Butanol tertiaire/NH₄OH/eau (3/1/1 v/v). Après développement, elle est détectée en lumière de Wood, éluee, et lyophilisée.

En conclusion, nous voyons que cette 2ème technique d'isolement présente, par rapport à la première, l'avantage de pouvoir fractionner des volumes plus importants de milieu de culture, tout en opérant plus rapidement puisque après 3 fractionnements successifs (Dowex - CM Séphadex - Séphadex G15) nous obtenons un produit débarrassé de sels, ce qui n'était pas le cas précédemment.

2 - Analyse de la cytokinine :

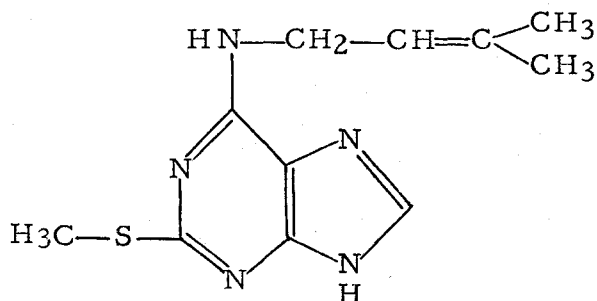
Nous avons vu plus haut qu'à partir des milieux de culture de bactéries phytopathogènes ou symbiotiques des plantes, la kinine produite était la 6 (γ, γ - diméthyl - allyl - amino) purine, encore appelée 6 - (3 - méthyl - 2 - butenylamino) purine ou 2 i P (Δ² isopentenyl) dont la formule chimique est représentée ci-dessous.



6-(3-méthyl-2-butenylamino) purine ou 2 i P.

(*) Nous remercions la direction et le personnel du Laboratoire du Phytotron qui a bien voulu nous fournir les tiges de tabac.

A partir des acides nucléiques d'Escherichia coli, comme nous le verrons plus loin, on a pu aussi isoler une autre cytokinine qui est très proche de la précédente puisqu'elle présente la même structure, mais avec, en position 2 sur le noyau purique, le radical methyl - thio :



6-(3-methyl-2-butenylamino)-2-methylthiopurine ou m s 2 i P.

Cependant, la phytohormone extraite des milieux de culture des Arthro bacter est différente de ces 2 cytokinines car en plus des coordonnées chromatographiques et des critères de solubilité que nous avons déjà souligné, son spectre U.V. est nettement distinct : Pour le 2 i P ce spectre, obtenu à partir d'une solution aqueuse, est caractérisé par $\lambda_{\max} = 269 \text{ m}\mu$ (pH.7) et $\lambda_{\min} = 234 \text{ m}\mu$ (pH 7) ; pour le m s 2 i P : par $\lambda_{\max} = 283 \text{ m}\mu$ et $\lambda_{\min} = 243 \text{ m}\mu$, alors que pour la cytokinine que nous avons isolée, après purification en chromatographie sur papier, il donne, dans l'eau : $\lambda_{\max} = 253 \text{ m}\mu$ et $\lambda_{\min} = 232 \text{ m}\mu$.

Afin de vérifier si nous n'étions pas en présence d'un nucléoside, d'un nucléotide, ou d'une structure plus complexe, nous avons essayé d'hydrolyser cette substance avec HCl N. à 100°C pendant 1 heure, ou à 120°C pendant 30mn. Après ce traitement, aucune modification n'est décelable en spectre U.V., et les propriétés chromatographiques restent identiques.

Pourtant, à partir du produit isolé après purification sur CM Séphadex provenant soit de la souche C'13, soit de la souche C 103, donc en présence du tampon phosphate - borax, nous avons obtenu un résultat par action de l'acide formique concentré à 170°C.

La technique utilisée est la suivante : les fractions correspondant à la cytokinine, récupérées après passage sur CM Séphadex C 50, sont concentrées à quelques ml, incorporées en présence d'un volume égal d'acide formique concentré dans des ampoules scellées, et portées à 170°C pendant 1 heure. Après ce traitement, la solution est concentrée à sec et reprise avec de l'eau distillé

plusieurs fois afin d'éliminer totalement l'acide formique. Une extraction par l'acétate d'éthyle saturé d'eau suivant la technique de BARTZ et coll. (1970) est alors effectuée et le produit obtenu, après concentration à sec, est repris par une solution d'HCl N/10. Il est alors éventuellement purifié par passage sur Séphadex G 15, sur résine cationique ou par chromatographie sur papier (avec le mélange isopropanol/HCl/eau 680/176/q. s. p. 1.000 ml, Rf. = 0,93 en migration descendante sur Whatman n° 1. Avec le mélange éthanol à 20 % dans l'eau bidistillée, Rf. = 0,59 en migration ascendante, toujours sur Whatman n°

La substance récupérée, en solution dans HCl N/10, donne le spectre U.V. représenté sur la figure 4 : $\lambda_{\max} = 282,5 \text{ m}\mu$ $\lambda_{\min} 242,5 \text{ m}\mu$. Ce spectre correspond à celui du m s 2 i P (HARADA et coll., 1968), mais l'absence de soufre dans la molécule de notre cytokinine, prouvée par la microanalyse et le spectre de masse (*) rejette cette possibilité.

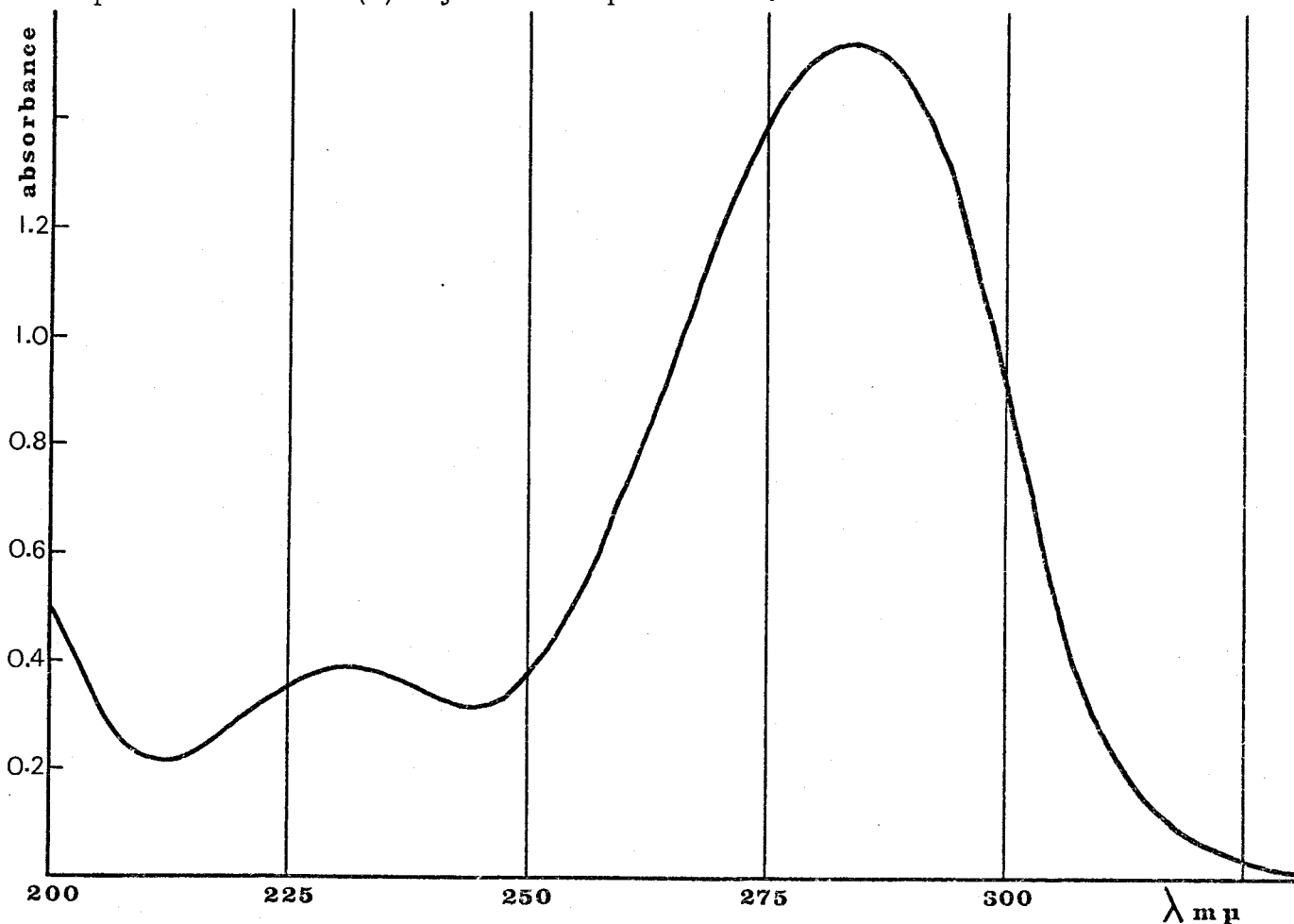


Fig. 4 : Spectre U. V. de la cytokinine, obtenu après action de l'acide formique (Spectrophotomètre Unicam SP 800).

(*) nous remercions Monsieur le Professeur LABLACHE - COMBIER qui nous a permis de faire analyser nos produits purifiés.

La molécule provenant de ce traitement à l'acide formique, soluble dans l'acétate d'éthyle, n'est cependant pas stable : par exemple, en gel filtration sur colonne de Séphadex G 15 (2,5 x 40 cm) éluée avec de l'eau distillée au rythme de 20 ml/h. on retrouve en grande partie cette substance dans les fractions (5 ml) voisines de la fraction 41, mais aussi un produit de dégradation élué dans la fraction 30 et voisines, dont le λ max. est nettement inférieur à 282,5 m μ .

En fonction des premiers résultats dont nous disposons actuellement, nous pensons que cette cytokinine produite par les Arthrobacter est proche des isopentenyl adenines. Cette hypothèse est appuyée par le microdosage du carbone (teneur voisine de 58 %) et de l'hydrogène (6,3 %). (Pour le 2 i P par exemple, le microdosage donne C = 59 % et H = 6,4 %).

L'étude en spectrométrie de masse, qui est en cours actuellement, nous permettra probablement de préciser cette structure moléculaire. Les très faibles quantités de produit récupérées après le fractionnement des milieux de culture rendent en effet très difficile l'étude précise en micro analyse.

Indépendamment de ce problème quantitatif, nous avons aussi rencontré d'autres difficultés qui peuvent être résumées en 3 points :

1) l'activité phytohormonale de la kinine produite dans les milieux de culture diminue très fortement après sa purification totale.

2) les potentialités propres à chaque souche de synthétiser des cytokinines se perdent progressivement lorsque ces souches sont repiquées de nombreuses fois sur milieu nutritif gélosé.

3) dans certains cas, avec la souche C 103 tout au moins, des cultures, récupérées après incubation, présentent une coloration jaunâtre provenant de la synthèse d'un pigment par les bactéries, qui interfère ensuite dans notre méthode de purification. (Le déterminisme de ce changement, probablement d'ordre génétique et non imputable à une contamination accidentelle, nous est inconnu).

Ces difficultés compliquent, bien sûr, l'étude de la nature de cette cytokinine d'origine bactérienne.

DISCUSSION GENERALE ET CONCLUSION.

Chez les bactéries, la production de substances absorbant les rayons U.V. dans le milieu de culture, et plus particulièrement de bases puriques et pyrimidiques, de nucléosides ou nucléotides, est un phénomène assez courant. Certaines conditions expérimentales, telles que l'appauvrissement du milieu de culture, accélèrent d'ailleurs souvent ce phénomène et on peut démontrer que dans la presque totalité des cas, celui-ci n'est pas simplement le résultat d'une autolyse des cellules (DEMAIN, 1968).

Les Brevibacterium, bactéries proches des Arthrobacter, ont particulièrement été étudiées à ce point de vue : ainsi, on a pu calculer par exemple que B. helvolum pouvait produire dans son milieu d'incubation jusqu'à 52 fois la quantité globale des substances absorbants à 260 m μ présentes dans ses propres cellules (FUKAMI et coll. 1963). De plus, les molécules excrétées sont parfois assez particulières : Br. liquefaciens synthétise ainsi une uridine di-phosphate-N-acetyl-glucosamine-peptide et d'autres UDP hexosamine (OKABAYASHI 1962).

Chez les Arthrobacter, nous savons que A. citreus peut accumuler des quantités appréciables d'acide 5' inosinique dans un milieu supplémenté avec de l'hypoxanthine, employée comme précurseur (NARA et coll. 1967). Ce dérivé est un produit de fermentation bactérienne, mais pour la cytokinine synthétisée par les Arthrobacter rhizosphériques nous ne pensons pas que son origine soit voisine, mais qu'elle provient plutôt des acides ribonucléiques de transfert (t RNA). Nous savons en effet que dans ces molécules, des substances de type cytokinine se trouvent souvent situées à côté de l'anticodon, et ceci, pour les t RNA d'origine bactérienne, comme pour ceux des végétaux et des levures par exemple.

Ainsi, pour Rhizobium leguminosarum et Corynebacterium fasciens, bactéries productrices de cytokinine comme nous l'avons indiqué plus haut, COPPOLA et coll. (1968) pour les premières, et MATSUBARA et coll. (1968) pour les secondes, ont pu démontrer que cette activité phytohormonale était aussi présente dans leur t RNA. A partir d'autres souches, on a pu même identifier

récemment les t RNA contenant des cytokinines dans leur molécule, et en déduire que seuls les t RNA dont la première lettre de l'anticodon permettait de reconnaître l'uracile dans le code génétique pouvait posséder ces cytokinines (ARMSTRONG et coll. 1969 et 1970 ; BARTZ et coll. 1970 ; BURROWS et coll. 1969). Précisons pourtant que dans ces t RNA, la cytokinine peut ne pas toujours être adjacente à l'anticodon (HECHT et coll. 1970), et que tous les t RNA dont la première lettre de l'anticodon correspond à l'uracile ne possèdent pas forcément des dérivés de type cytokinine. Pour les Arthrobacter, nous pensons d'ailleurs qu'il serait intéressant d'étudier cet aspect du problème.

Enfin cette cytokinine synthétisée dans la zone rhizosphérique des plantes, peut intervenir soit à l'extérieur de ces plantes, soit dans leur métabolisme propre, après absorption radiculaire. Dans la rhizosphère, cette phytohormone pourrait en effet stimuler la croissance de certains microorganismes : algues, actinomycétales ou bactéries. LETHAM (1967) souligne d'ailleurs l'intérêt des travaux de QUINN, OATES et BEERS, relatifs à l'action des cytokinines sur la multiplication de Bacillus megaterium, Agrobacterium tumefaciens et autres bactéries. Dans le métabolisme des végétaux, nous savons qu'elles peuvent intervenir à de nombreux niveaux, et en particulier dans l'initiation et la régulation de la synthèse des acides nucléiques, dans la régulation des néoformations d'organes, de la dominance apicale et de la dichotomisation, dans la stimulation de la floraison, enfin dans la régulation du transport des molécules dans le phloème et de la mobilisation des métabolites (HELGESON, 1968).

CONCLUSIONS GENERALES

Ce travail consacré à l'étude des interactions entre la plantule de Colza et les microorganismes telluriques au niveau de son aire racinaire nous amène à tirer les conclusions suivantes :

1 - Les substances organiques éliminées par le système racinaire de ces plantules, et plus particulièrement les acides aminés, permettent l'établissement d'une microflore rhizosphérique dont les caractéristiques physiologiques et nutritionnelles aussi bien que le spectre bactérien la distinguent de la microflore tellurique. Certains germes : les Arthrobacter, sont particulièrement nombreux dans cette rhizosphère, et leur présence explique l'importante activité ammonifiante et protéolytique dans les milieux de culture des plantules de Colza.

Cependant, cette richesse en Arthrobacter n'est pas spécifique au Colza, et peut être généralisée pour d'autres plantes. Elle est fonction de la teneur relativement élevée de ces Corynébactéries dans la microflore des terres de la région du Nord, employées pour nos expériences. Les exigences nutritionnelles de ces Arthrobacter, et en particulier leurs besoins en acides aminés, permettent pourtant de différencier les souches d'origine rhizosphérique des souches typiquement telluriques.

2 - Cette microflore rhizosphérique est capable de synthétiser des facteurs de croissance de type vitaminique ainsi que des substances de type phytohormonal. Pour les facteurs vitaminiques, une attention particulière a été portée sur l'évolution des composés foliques et de la vitamine B₁₂ dans la rhizosphère. Des résultats obtenus, il ressort que la microflore rhizosphérique du Colza, et les Arthrobacter en particulier, produisent de la vitamine B₁₂ qui peut être absorbée par les plantes et que l'on retrouve dans les tissus des végétaux. Par contre, l'augmentation de l'activité folique dans la rhizosphère est due principalement à un autre phénomène : la libération par voie enzymatique d'origine bactérienne des formes foliques libres à partir des dérivés conjugués, libérés par les racines.

Enfin, en ce qui concerne les substances phytohormonales, en plus de l'acide β indolyl acétique, les Arthrobacter synthétisent une substance de type cytokinine dont l'action sur le système racinaire du Colza conduit à l'apparition d'une dichotomie très prononcée et à la prolifération d'un manchon très dense de poils absorbants.

Ces résultats nous conduisent à évoquer quelques problèmes se situant parfois dans un contexte un peu plus vaste que la rhizosphère, mais dont l'étude nous semble digne d'être abordée, aussi bien du côté végétal que du côté microbien.

En effet, si nous savons qu'il est très probable que les plantes peuvent utiliser certains produits du métabolisme bactérien tels que des acides aminés ou des molécules à faible poids moléculaire, nous ignorons leur comportement vis à vis des macromolécules excrétées par les bactéries, ou libérées au moment des lyses au contact des racines. Or, nous avons déjà soupçonné dans les cultures d'Arthrobacter la présence de molécules de type polynucléotidique. Parfois aussi, à partir d'extrait de plantules de Colza ayant germées en présence d'Arthrobacter, nous avons remarqué après chromatographie sur papier, en lumière de Wood, la présence de substances qui n'existent pas dans les extraits provenant de germinations stériles. A la lumière des travaux de LEDOUX et coll. (1968 et 1969) et STROUN et coll. (1970 et 1971) qui, dans un contexte expérimental différent du nôtre, ont pu prouver la présence, à l'intérieur des cellules végétales, de molécules telles que des acides nucléiques bactériens d'origine exogène, il nous semble intéressant d'étudier ce phénomène au niveau des interactions rhizosphériques.

Dans un autre domaine, celui de l'équilibre biologique des microorganismes du sol, les pouvoirs de synthèse des bactéries rhizosphériques, qu'elles soient des Arthrobacter comme nous l'avons constaté dans nos expériences ou qu'elles soient des Pseudomonas comme le démontre d'autres chercheurs, doit probablement permettre l'établissement d'un cycle annuel au cours duquel les différentes flores bactériennes se succèdent. En effet, la synthèse des facteurs vitaminiques due à la prolifération des germes rhizosphériques, si elle peut difficilement, à cause de la faible concentration des vitamines produites, intervenir dans la nutrition des plantes, peut par contre stimuler la croissance des germes à exigences nutritionnelles très élevée dont l'activité succédera à celle des germes rhizosphériques. Leur rôle permettra, par exemple, la dégradation de molécules complexes exigeant l'intervention de nombreuses enzymes.

Enfin, le comportement des plantes vis à vis des agents pathogènes ne pourrait-il pas, dans certains cas, s'expliquer par l'effet rhizosphère ? En effet, nous avons déjà signalé plus haut que PETERSON et coll. (1957) trouvaient dans une terre non infectée, plus d'Arthrobacter dans la zone rhizosphérique d'une variété de lin résistante à Fusarium oxysporum que dans la rhizosphère d'une variété sensible. Nous savons aussi depuis les travaux de NEAL et coll. (1967) qu'une substitution disomique de chromosome chez un blé, provoquant la perte de sa résistance à certaines maladies cryptogamiques, conduit corrélativement à des changements dans la microflore rhizosphérique. Pour le Colza, nous n'avons pas abordé ce problème sur le plan expérimental, mais il serait peut être intéressant d'analyser le spectre bactérien de la rhizosphère en fonction de ces différences variétales.

BIBLIOGRAPHIE

- AMOROS M. & DURAND G. — Libération de diverses substances par des graines de légumineuses au cours de leur imbibition - Ann. Inst. Pasteur, 1964, 107, 79-85.
- ANDAL R.K., BHUVANESWARI N.S. & SUBBA-RAO — Roots exudates of paddy. - Nature, 1956, 178, 1063.
- ANDERSON B.B. & COWAN J.D. — Effect of light on the Lactobacillus casei microbiological assay. - J. Clin. Path., 1968, 21, 85-87.
- ARKAD'EVA Z.A. — Rapports entre le maïs et quelques bactéries de la microflore des racines (en Russe). - Mikrobiologija, 1963, 32, 79-85.
- ARMSTRONG D.J., SKOOG F., KIRKEGAARD L.H., HAMPEL A.E., BOCK R.M., GILLAM I. & TENER G.M. — Cytokinins : distribution in species of yeast transfert RNA. - Proc. Nation. Acad. Sci., 1969, 63, 504-511.
- ARMSTRONG D.J., BURROWS W.J., SKOOG F., ROY K.L. & SOLL D. — Cytokinins : Distribution in transfer RNA species of Escherichia coli. - Proc. Nation. Acad. Sci., 1969, 63, 834-841.
- ARMSTRONG D.J., EVANS P.K., BURROWS W.J., SKOOG F., PETIT J.F., DAHL J.L., STEWARD T., STROMINGER J.L., LEONARD N.J., HECHT S.M. & OCCOLOWITZ J. — Cytokinins. Activity and identification in Staphylococcus epidermidis transfer ribonucleic acid. - J. Biol. Chem., 1970 245, 2922-2926.
- ARONOVITCH J. & GROSSOWICZ N. — Nutrition and vitamin B₁₂ metabolism of a soil bacterium. - J. Gen. Microbiol., 1968, 50, 195-206.
- AUGIER J. & MOREAU R. — L'activité amylolytique des sols. Méthode d'étude et interprétation. - Ann. Inst. Pasteur, 1960, 99, 131-141.
- AYERS W.A. & THORNTON R.H. — Exudation of amino acids by intact and damaged roots of wheat and peas. - Plant and Soil, 1968, 28, 193-207.
- BABOTH E. — The incorporation of ⁶⁰Co into vitamin B₁₂ pea seedling. - Bot. Közl, 1965, 52, 71-78.
- BALASUBRAMANIAN A. & RANGASWARI G. — Foliar application of ¹⁴C glucose and ³²P phosphate and detection of radioactivity in the root exudate of sorghum. - Curr. Sci., 1968, 37, 172-173.
- BALICKA N. — Activité biologique comparée des rhizosphères du seigle et de la vesce en culture pure ou mixte. - Ann. Inst. Pasteur., 1968, 95, 480-491.

- BALICKA N. — The influence of the medium on production of free amino acids by some rhizosphere bacteria. - Plant microbes relationships, Proc., Symp., Prague, 1963, 101-108.
- BALICKA N., KOSINKIEWICZ B., KREZEL Z. & LESZCZYNSKA D. — Certains aspects du métabolisme de l'azote dans la rhizosphère. - Ann. Inst. Pasteur, 1965, 109, 50-61.
- BARJAC H. de — La puissance dénitrifiante du sol. Mise au point d'une technique d'évaluation. - Ann. Inst. Pasteur, 1952, 83, 207-212.
- BARJAC H. de & POCHON J. — Titrage du pouvoir ammonifiant de la microflore des sols. - Ann. Inst. Pasteur, 1953, 85, 82-89.
- BARKER H.A., SMYTH R.D., WEISSBACH H., MUNCH-PETERSEN A., TOOHEY J.I., LADD J.N., VOLCANI B.E. & WILSON R.M. — Assay, purification, and properties of the adenylcobamide coenzyme. - J. Biol. Chem., 1960, 235, 181-190.
- BARTHE P. — Recherche de substances de type cytokinine synthétisées par Nectria galligena Bres. var. major Wr, en culture pure. - C.R. Acad. Sci., 1971, 272, 2881-2883.
- BARTON L.V. & MAC NAB J. — Relation of different gases to the soaking injury of seeds - III. Some chemical aspects. - Contrib. Royce Thompson Inst., 1956, 18, 339-356.
- BARTZ J., SOLL D., BURROWS W.J. & SKOOG F. — Identification of the cytokinine active ribonucleosides in pure Escherichia coli t RNA species. - Proceed. Nat. Acad. Sciences, 1970, 67, 1448-1453.
- BELIKOV P.S. & KIRILLOVA T.V. — Périodicité nyctémérale de l'activité de synthèse des racines (en Russe). - Izvest. timirjaz. selskokh. Akad., 1960, 5, 35-44.
- BELIKOV P.S. & KIRILLOVA T.V. — Dynamique de l'excrétion de certaines substances par le coléoptile d'orge sous l'action de la chaleur (en Russe). - Izvest. timirjaz. selskokh. Akad., 1962, 6, 61-68.
- BERTAUX O., N'GUYEN CONG H. & VALENCIA R. — La sensibilité des microorganismes aux facteurs de croissance. I. Dosage de l'acide folique par Streptococcus faecalis et composition du milieu de base. - Ann. Nutr. Alim., 1969, 23, A77-A87.
- BERTHELOT A. & AMOUREUX G. — Sur la formation d'acide indole-3-acétique dans l'action de Bacterium tumefaciens sur le tryptophane. - C.R. Acad. Sci., 1938, 206, 537-540.

- BHUVANESWARI K. & SUBBA-RAO N.S. — Root exudates in relation to the rhizosphere effect. - Proc. Ind. Acad. Sci., 1957, 45, 299-301.
- BICKOFF E.M., LIVINGSTON A.L. & SNELL N.S. — The occurrence of vitamin B₁₂ and other growth factors in alfalfa. - Arch. Biochem., 1950, 28, 242-252.
- BIRD O.D., Mc GLOHON V.M. & VAITKUS J.W. — Naturally occurring folates in the blood and liver of the rat. - Anal. Biochem., 1965, 12, 18-34.
- BIRD O.D., Mc GLOHON V.M. & VAITKUS J.W. — A microbiological assay system for naturally occurring folates. - Can. J. Microbiol., 1968, 15, 465-472.
- BLONDEAU R. — Effet rhizosphère de l'endive (Cichorium intibus) en culture hydroponique. - Bull. Soc. Bot. Nord Fr., 1965, 18, 62-68.
- BLONDEAU R. — Elimination de substances organiques au cours de la germination du Colza (Brassica Napus oleifera) I. Oses, acides aminés, acides organiques. - Bull. Soc. Bot. Nord France, 1965, 18, 97-105.
- BLONDEAU R. — Elimination de substances organiques au cours de la germination du Colza (Brassica Napus oleifera) II. Vitamines du groupe B. Bull. Soc. Bot. Nord France, 1966, 19, 72-78.
- BLONDEAU R. — Activité biologique de la microflore autour du système racinaire du Colza (Brassica napus) pendant les premiers stades de sa croissance. - Bull. Soc. Bot. Nord Fr., 1966, 19, 27-36.
- BLONDEAU R. — Cinétique de l'évolution des acides aminés et des vitamines hydrosolubles dans la rhizosphère des plantules de Colza (Brassica Napus oleifera). - C.R. Acad. Sci., 1968, 266, 2017-2020.
- BLONDEAU R. — Technique de culture pour l'étude des interactions microbiennes au niveau du système racinaire des plantules. - Bull. Soc. Bot. Nord Fr., 1968, 21, 99-104.
- BLONDEAU R. — Spécificité de la biosynthèse de certains facteurs vitaminiques dans la rhizosphère des plantules de Colza. - Ann. Inst. Pasteur, Lille, 1969, 20, 255-260.
- BLONDEAU R. — Etude des composés foliques présents dans la rhizosphère des plantules de Colza (Brassica napus oleifera). - C.R. Acad. Sc., 1969, 268, 1998-2001.

- BLONDEAU R. — Les Arthrobacter de la microflore rhizosphérique des plantules de Colza. - Ann. Inst. Pasteur, Lille, 1970, 21, 295-305.
- BLONDEAU R. — Mise en évidence de la production de vitamine B₁₂ par la microflore rhizosphérique des plantules de Colza (Brassica napus oleifera). - C.R. Acad. Sc., 1970, 270, 2040-2043.
- BLONDEAU R. — Production d'une substance de type cytokinine par des Arthrobacter d'origine rhizosphérique. - C.R. Acad. Sc., 1970, 270, 3158-3161.
- BLONDEAU R. — La vitamine B₁₂ des végétaux supérieurs. - C.R. Acad. Sc., 1971, 272, 2781-2784.
- BOGE G. & BRAEKKAN O.R. — Nutrients in grass seeds III B vitamins in whole seeds. - Acta Agric. Scand., 1967, 17, 195-198.
- BORNER H. — Die Ausscheidung organischer Verbindungen aus den Samen von Roggen (Secale cereale L.), Weizen (Triticum aestivum L.) und Gerste (Hordeum vulgare L.) während der quellung. - Naturwiss., 1955, 42, 48.
- BORNER H. — Die Abgabe organischer Verbindungen aus den Karyopsen, Wurzeln und Ernterückständen von Roggen (Secale cereale L.), Weizen (Triticum aestivum L.) und Gerste (Hordeum vulgare L.) und ihre Bedeutung bei der gegenseitigen Beeinflussung der höheren. - Pflanzen, Beitr. Biol. Pflanz., 1956, 33, 33-83.
- BOULLARD B. & MOREAU R. — Sol, microflore et végétation. - Masson ed., Paris, 1962, 172p.
- BOULTER D., JEREMY J.J. & WILDING M. — Amino acids liberated into the culture medium by pea seedling roots. - Plant and Soil, 1966, 24, 121-127.
- BOWEN G.D. — Nutrient status effects on loss of amides and amino acids from pine roots. - Plant and Soil, 1969, 30, 139-141.
- BOWEN G.D. & ROVIRA A.D. — The effects of micro-organisms on plant growth I. Development of roots and root hairs in sand and agar. - Plant and Soil, 1961, 15, 166-192.
- BREED R.S., MURRAY E.G.D. & SMITH N.R. — Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. - 7e edit., Williams and Wilkins, Baltimore, 1957.
- BRISBANE P.G. & ROVIRA A.D. — A comparison of methods for classifying rhizosphere bacteria. - J. Gen. Microbiol., 1961, 26, 379-392.

- BROWN R., GREENWOOD A.D., JOHNSON A.W. & LONG A.G. — The stimulant involved in the germination of Orobanche minor. - Biochem. J., 1951, 48, 559-564 & 564-568.
- BUNT J.S. & ROVIRA A.D. — Microbiological studies of some subantarctic soils. - J. Soil Sci., 1955, 6, 119-128.
- BURROWS W.J., ARMSTRONG D.J., SKOOG F., HECHT S.M., BOYLE J.T.A., LEONARD N.J. & OCCOLOWITZ J. — The isolation and identification of two cytokinins from *Escherichia coli* transfert ribonucleic acids. - Biochemistry, 1969, 8, 3071- 3076.
- BUTTIAUX R., BEERENS H. & TACQUET A. — Manuel de techniques bactériologiques. - Ed. Medicales Flammarion, Paris, 1963, 572p.
- CARE M. — Contribution à l'étude des substances excrétées par les racines des végétaux supérieurs. - Thèse Doct. Pharm. Lille. Imprimerie Centrale, 1959, 94 p.
- CEZARD R. — L'excrétion radicellaire chez les végétaux supérieurs. - Bull. Ec. Nation. Sup. Agron. Nancy., 1966, 3, 114-166.
- CHALVIGNAC M.A. — Modifications apportées à la technique d'appréciation de la microflore ammonifiante. - Informations Techniques de Microbiologie du Sol, 1962, 1, 25-27.
- CHALVIGNAC M.A. — Contribution à l'étude de la rhizosphère du lin. - Thèse, Paris, 1965, 127p.
- CHAN E.C.S. & KATZNELSON H. — Growth interactions of Arthrobacter globiformis and Pseudomonas sp. in relation to the rhizosphere effect. - Canad. J. Microbiol., 1961, 7, 759-767.
- CHAN E.C.S., KATZNELSON H. & ROUATT J.W. — The influence of soil and root extracts on the associative growth of selected soil bacteria. - Canad. J. Microbiol., 1963, 9, 187-197.
- COOK F.D. & LOCHHEAD A.G. — Growth factor relationships of soil microorganisms as affected by proximity to the plant root. - Can. J. Microbiol., 1959, 5, 323-334.
- COPPER W.S. & STOESZ A.D. — The subterranean organs of Helianthus scaberrimus. - Bull. Torrey Bot. Club, 1931, 58, 67-72.
- COPPOLA S. & GIANNATTASIO M. — Attivita citochinica in frazioni dell'acido ribonucleico isolato dal Rhizobium leguminosarum frank. - "Annali" della Fac. di Sci. Agrarie dell'Univ. di Napoli, 1968, 3, 3-7.
- COPPOLA S. & GIANNATTASIO M. — Attivita citochimica in un actinomicet rizosferico. - Bull. Soc. Ital. Biol. Sper., 1968, 44, 1913-1915.

- DARBYSHIRE J.F. & GREAVES M.P. — An improved method for the study of the interrelationships of soil microorganisms and plant roots. - Soil. Biol. Biochem., 1970, 2, 63-71.
- DART P.J. & MERCER F.V. — The legume rhizosphere. - Arch. Mikrobiol., 1964, 47, 344-378.
- DASTE P. — Recherches sur l'écologie bactérienne dans la rhizosphère de quelques plantes supérieures. - Rev. Cytol. Biol. Veg., 1958, 19, n° 1, 251 p.
- DAVEY C.B. & PAPAIVIZAS G.C. — Translocation of streptomycin from coleus leaves and its effect on rhizosphere bacteria. - Science, 1961, 134, 1368-1369.
- DE CANDOLLE A.P. —
Physiologie végétale, 1832, 3, 1474-1475.
- DEHAY C. & CARRE M. — Etude de la composition de quelques excréctions radicellaires. - C.R. Acad. Sci., 1957, 244, 230-233.
- DEHAY C. & CARRE M. — Etude de la composition des excréctions radicellaires chez quelques légumeuses d'origine africaine. - C.R. Acad. Sci., 1958, 247, 336-338.
- DELEUIL G. — Mise en évidence de substances toxiques pour les thérophytes dans les associations du Rosmarino-Ericion. - C.R. Acad. Sci., 1950, 230, 1362-1364.
- DEMAIN A.L. — Production of purine nucleotides by fermentation. - Prog. Ind. Microbiol., 1958, 8, 35-72.
- DEWEY V.C. & KIDDER G.W. — The use of Sephadex for the concentration of pteridines. - J. chromatog., 1967, 31, 319-325.
- DJAVADI F. & MANGENOT F. — Influence des exsudats radicellaires des plantules de cotonniers sensibles, tolérants et résistants, sur certains aspects du métabolisme du Verticillium dahliae Kleb. - C.R. Acad. Sc., 1969, 267, 309-312.
- DOCTOR V.M. & COUCH J.R. — Occurrence and properties of a conjugated form of Leuconostoc citrovorum factor. - J. Biol. Chem., 1953, 200, 223-231.

- DOMMERGUES Y. & MANGENOT F. — Ecologie microbienne du sol. - Masson ed., Paris, 1970, 796 pages.
- Mc DOUGALL B.M. — The exudation of ^{14}C labelled substances from roots of wheat seedlings. - 9th Intern. Congr. Soil. Sci., 1968, 647-655.
- Mc DOUGALL B.M. — Movement of ^{14}C photosynthate into the roots of wheat seedlings and exudation of ^{14}C from intact roots. - New Phytologist, 1970, 69, 37-46.
- Mc DOUGALL B.M. & ROVIRA A.D. — Sites of exudation of ^{14}C labelled compounds from wheat roots. - New Phytologist., 1970, 69, 399-1003.
- DREW M.C., SEEAR J. & Mc LAREN A.D. — Entry of basic macromolecules into barley roots. - Amer. J. Bot., 1970, 57, 837-843.
- DUDA J., PEDZIWIŁK Z. & ZODROW K. — Studies on the vitamin B₁₂ content of the leguminous plants. - Acta Microbiol. Polonica, 1957, 6, ¹² 233-238.
- EBERHARDT F. & MARTIN P. — Das Problem der Wurzelaußscheidungen und seine Bedeutung für gegenseitige Beeinflussung höherer Pflanzen. - Zeitsch. Pflanzenkrank.u. Pflanzenschutz, 1957, 64, 193-205.
- ELWAN S.H. & DIAB A. — Studies in desert microbiology. IV. Bacteriology of the root region of a fodder xerophyte in relation to environment. - V.A.R.J. Bot., 1970, 13, 159-169.
- FALLOT J., ROUCH J., SALACROUP F. & CABASSY S. — Action de Bacillus megaterium et de Pseudomonas fluorescens sur la croissance de racines excisées. - Ann. Inst. Pasteur., 1966, 111, 75-88.
- FALLOT J., SALACROUP F. & DURAND G. — Action rhizogène de certaines substances synthétisées par les bactéries. - Bull. Acad. Soc. lorraines Sci., 1970, 9, 112-121.
- FLYNN L. — Collaborative study of microbiological assay for folic acid in food. - J. Ass. Off. Agric. Chemist., 1964, 47, 765-771.
- FORD J.E. — The microbiological assay of vitamin B₁₂. The specificity of the requirement of Ochromonas malhamensis for cyanocobalamin. - Brit. J. Nutr., 1953, 7, 299-306.
- FRANK H. — Über den Stickstoffverlust bei alternden Pflanzen. - Planta, 1954, 44, 319-340.

- FRENZEL B. — Zur Abgabe von Aminosäuren und Amiden an das Nährmedium durch die Wurzeln von Helianthus annuus. - *Planta*, 1957, 49, 210-234.
- FRIES L. — Vitamin B₁₂ in Pisum sativum (L.) - *Phys. Plant.*, 1962, 15, 566-571.
- FRIES N. & FORSMAN B. — Quantitative determination of certain nucleic acid derivatives in pea-root exudate. - *Physiol. Plant.*, 1951, 4, 410-420.
- FUKAMI T., IMANAKA H., YOKOTA M., FUJIWARA M., TAMURA G. & ARIMA K. —
J. Agr. Chem. Soc., 1963, 37, 505.
- FURUYA A., ABE S. & KINOSHITA S. — Production of nucleic acid-related substances by fermentative processes. XXVIII : Accumulation of 5' inosinic acid by a manganese-insensitive mutant of Brevibacterium ammoniagenes. - *Appl. Microbiol.*, 1969, 18, 977-984.
- GASSNER G. & FRANKE W. — Einige Versuche über den Stickstoffhaushalt lichtkeimender Samen im dunklen Keimbett. - *Zn. Botan.*, 1935, 28, 446-463.
- GIANNATTASIO M. & COPPOLA S. — Isolamento di citochinine dal Rhizobium leguminosarum Frank. - *Giorn. Bot. Ital.*, 1969, 103, 11-17.
- GIRARD TH. — Contribution à l'étude de la rhizosphère de Digitalis Purpurea L. Incidence sur sa biologie. - Thèse Doctorat Pharmacie - Nancy - 1963.
- GOATLEY J.L. & LEWIS R.W. — Composition of guttation fluid from rye, wheat, and barley seedlings. - *Plant Physiol.*, 1966, 41, 373-375.
- GOUNOT A.M. — La microflore des limons argileux souterrains : son activité productrice dans la biocoenose cavernicole. - *Annales de Spéléologie*, 1967, 22, fasc. 1, 121p.
- GRAY L.F. & DANIEL L.D. — Studies of vitamin B₁₂ in turnip greens. - *J. of nutrition*, 1959, 67, 623-634.
- GUIRGUIS M.A., KUNC F. & VANCURA V. — Presence and oxidation of amino acids in rhizosphere and non-rhizosphere soil. - *Folia microbiol.* 1969, 14, 1-12.
- GVAMICHAHA N.E. — Elimination des vitamines par les racines (en georgien). - "Fizilogija drevesnykh rastenij II", Tbilisi, Izdat. Mecniereba, 1966, 5-15.

- GYLLENBERG H. — The "rhizosphere effect" of graminaceous plants in virgin soils. - *Physiol. Plant.*, 1955, 8, 644-652.
- HAKALA M.T. & WELCH A.D. — A conjugated form of citrovorum factor synthesized by Bacillus subtilis. - *Fed. Proc.*, 1955, 14, 222.
- HAN NGUYEN CONG & VALENCIA R. — A propos du dosage microbiologique de la vitamine B₁₂ par Ochromonas malhamensis. - *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1964, 46, 751-754.
- HARADA F., GROSS H.J., KIMURA F., CHANG S.H., NISHIMURA S. & RAJBHANDARY U.L. — 2-Methylthio N⁶ - (Δ^2 -isopentenyl) adenosine : a component of E. coli tyrosine transfer RNA. - *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1968, 33, 299-306.
- HAYASHI M. & KAMIKUBO T. — Biosynthesis and properties of 2-thioadeny cobamide and its coenzyme form. - *Febs Letters*, 1971, 15, 213-216.
- HAYMAN D.S. — A note on the quantitative determination of carbohydrate in exudate from single cotton seeds and its significance. - *Canad. J. Bot.*, 1969, 47, 1521-1523.
- HECHT S.M., BOCK R.M., LEONARD W.J., SCHMITZ R.Y. & SKOOG F. — Cytokinin activity in tRNA^{Phe}. - *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1970, 41, 435-440.
- HELDER R.J. — The loss of substances by cells and tissues. - *Encyclopedia of Plant Physiology Springer Verlag Berlin*, 1956, 2, 468-488.
- HELGESON J.P. — The cytokinins. Synthetic and naturally occurring N⁶ substituted adenine derivatives profoundly affect plant growth. - *Science*, 1968, 161, 974-981.
- HELGESON J.P. & LEONARD N.J. — Cytokinins : identification of compounds isolated from Corynebacterium fascians. - *Proc. Nat. Acad. Sc.*, 1966, 56, 60-63.
- HENDLIN D., KODITSCHKEK L.K. & SOARS M.H. — Investigations of the biosynthesis of citrovorum factor by lactic acid bacteria. - *J. Bacteriol.*, 1953, 65, 466-471.
- HENNEQUIN J.R. & BLACHERE H. — Recherches sur la synthèse de phyto-hormones et de composés phénoliques par Azotobacter et des bactéries de la rhizosphère. - *Ann. Inst. Pasteur*, 1966, 111, 89-102.
- HOF BAUER J. & MINAR J. — Amino acids and growth substances in barley root exactions (Hordeum distichon L.) and their biological effect. - *Biologia Plantarum*, 1968, 10, 166-176.

- HOFNER V.W. — Nachweis und trennung organischer verbindungen des zinks und des kobalts im exsudat von Helianthus annuus durch gelfiltration an sephadex. - Z. Pflanzenernähr. Bodenkunde., 1969, 123, 11-21.
- HUSAIN S.S. & Mc KEEN W.E. — Interactions between strawberry roots and Rhizoctonia fragariae. - Phytopath ., 1963, 53, 541-545.
- HUSSAIN A. & VANCURA V. — Formation of biologically active substance by rhizosphere bacteria and their effect on plant growth. - Folia Microbiol., 1970, 15, 468-478.
- ITAI C. & VAADIA Y. — Kinetine like activity in root exudate of water stressed sunflower plants. - Physiol. Plant., 1965, 18, 941-944.
- IVANOV V.P., JAKOBSON G.A. & SMIRNOVA V.I. — Le rôle des microorganismes de la rhizosphère dans les relations entre plantes au moyen des excretions radiculaire (en russe). - Fiziol. Rasten., 1967, 14, 683-692.
- IVARSON K.C. & KATZNELSON H. — Studies on the rhizosphère microflora of yellow birch seedling. - Plant and soil., 1960, 12, 30-40.
- IWAI K. & NAKAGAWA S. — Studies on folic acid group in plant tissues. X. Isolation and identification of folic acid group in green leaves. - Mem. Res. Inst. Food Sci., Kyoto Univ., 1958, 15, 49-60.
- JAENICKE L. & BRODE E. — Untersuchungen über unkohlenstoffkörper. I. Die tetrahydrofolatformylase aus tanbenleber reinigung und mechanismus. - Biochem. Z., 1961, 334, 108-132.
- JALALI B.L. & SURYANARAYANA D. — Shift in the carbohydrate spectrum of root exudates of wheat in relation to its root-rot disease. - Plant and soil., 1971, 34, 261-267.
- JENNY H. & GROSSENBACHER K. — Root-soil boundary zones as seen in the electron microscope. - Proc. Soil. Sci. Soc. Am., 1963, 27, 273-277.
- JONES K.M., GUEST J.R. & WOODS D.D. — Folic acid and the synthesis of methionine by extracts of Escherichia coli. - Biochem. J., 1961, 79, 566-574.
- JUKES T.H. & STOKSTAD E.L.R. — Pteroylglutamic acid and related compounds. - Physiol. Rev., 1948, 28, 51-106.

- KALYANASUNDARAM R. — Production of fusaric acid by Fusarium lycopersici Sacc. in the rhizosphere of tomato plant. - *Phytopathol. Zeits.*, 1958, 32, 25-34.
- KANDLER O. — Papierchromatographischer Nachweis Aminosäureausscheidung in vitro kultivierte Maiswurzeln. - *Zeitsch. Naturfor.*, 1951, 66, 437-444.
- KASZUBIAK H. — Sparteine decomposing microorganisms in the rhizosphere of lupine. - *Acta microbiol. polon.*, 1965, 14, 101-107.
- KATZNELSON H. — Recent studies on the rhizosphere phenomenon. - *Trans. 7th. Intern. Congr. Soil. Sci.*, Madison, 1960, 3, 537-544.
- KATZNELSON H. & ROUATT J.W. — Studies on the incidence of certain physiological groups of bacteria in the rhizosphere. - *Can. J. Microbiol.*, 1957, 3, 265-269.
- KATZNELSON H., ROUATT J.W. & PAYNE T.M.B. — Liberation of amino-acids by plant roots in relation to dessication. - *Nature*, 1954, 174, 1110-1111.
- KATZNELSON H., ROUATT J.W. & PAYNE T.M.B. — The liberation of amino-acids and reducing compounds by plant roots. - *Plant and soil.*, 1955, 7, 35-48.
- KATZNELSON H., ROUATT J.W. & PAYNE T.M.B. — Recent studies on the microflora of the rhizosphere. - *Rapp. VI Cong. Intern. Sci. Sol Paris*, 1956, 3, 151-156.
- KATZNELSON H. & SIROIS J.C. — Auxin production by species of Arthrobacter. - *Nature (London)*, 1961, 191, 1323-1324.
- KATZNELSON H. & SIROIS J.C. — Production of a gibberellin-like substance by Arthrobacter globiformis. - *Nature*, 1962, 196, 1012-1013.
- KATZNELSON H. & STREZELCZYK E. — Studies on the interaction of plants and free-living nitrogen-fixing microorganism. - *Can. J. Microbiol.*, 1961, 7, 437-446
- KAZARJAN V.O. & KARAPETJAN K.A. — Sur l'élimination d'acides aminés par les racines de végétaux (en russe). - *Akad. Nank. arm. S.S.S.R.*, 1961, 32, 159-162.
- KAZENKO A. & LASKOWSKI M. — On the specificity of chichen pancreas conjugase (γ -glutamic acid carboxypeptidase). - *J. Biol. Chem.*, 1948, 173, 217-221.

- KEDDIE R.M., LEASK B.G.S. & GRAINGER J.M. — A comparison of coryneform bacteria from soil and herbage : cell wall composition and nutrition. - J. Appl. Bact., 1966, 29, 17-43.
- KENDE H. — Kinetinlike factors in the root exudate of sunflowers. - Proc. Nat. Acad. Sci., 1965, 53, 1302-1307.
- KENNEDY J.F. — Liquid scintillation counting medium for aqueous samples. - Experientia, 1969, 25, 1120.
- KERESZTESY J.C. & SILVERMAN M. — Crystalline citrovorum factor from liver. - J. Am. Chem. Soc., 1951, 73, 5510.
- KERWAR S.S., SPEARS C., Mc AUSLAN B. & WEISSBACH H. — Studies on vitamin B₁₂ metabolism in Hela cells. - Arch. Biochem. Biophys., 1971, 142, 231¹²-237.
- KHAN I.U. — A technique for growing citrus seedlings under aseptic conditions of culture. - Phytopath., 38, 756-757.
- KIM W.K. — Effect of excision and benzimidazole treatment on folate content of wheat leaves and wheat leaf chloroplasts. - Can. J. Biochem., 1970, 48, 1091-1095.
- KING H. de & WALLACE R.H. — Morphological and physiological groups of soil bacteria from the roots of barley and oats. - Can. J. Microbiol., 1956, 2, 473-481.
- KIRALY Z., POZSAR B.I. & EL HAMMADY M.E. — Cytokinin activity in rust infected plants : juvenility and senescence in diseased leaf tissues. - Acta Phytopathol., 1966, 1, 29-37.
- KISELEVA N.T. — Synthèse de l'acide nicotinique et de la thiamine par des bactéries de la rhizosphère du cotonnier à fibres fines (en russe). - Izvest. Akad. Nauk turkm SSR, Biol. Nauk., 1967, 4, 10-17.
- KLAMBT D. — Nachweis erne Cytokinins aus Agrobacterium tumefaciens und sein Vergleich mit den cytokinin aus Corynebacterium fasciens. - Wissensch. Z. Univ., Rostock, 1967, 16, 623-625.
- KLAMBT D. — Cytokinine aus Helianthus annuus. - Planta, 1968, 82, 170-178.
- KLAMBT D., THIES G. & SKOOG F. — Isolation of cytokinins from Corynebacterium fasciens. - Proc. Nat. Acad. Sc., 1966, 56, 52-59.

- KLIEWER M. & EVANS H.J. — B₁₂ - coenzyme content of the nodule from legumes, alder and of Rhizobium meliloti. - Nature, 1962, 194, 108-109.
- KOSSEY-FEJER O. — Gehalt der Wurzel von Keimpflanzen an freiem Methionin. - Naturwissenschaften, 1961, 48, 410-411.
- KREZEL Z. — Rhizosphere microorganisms as a factor influencing resistance of plants to infections. - Acta Microbiol. Polon., 1966, 15, 163-171
- KUNG F. & MACURA J. — Decomposition of root exudates in soil. - Folia Microbiol., 1966, 11, 239-247.
- LAJUDIE J. & CHALVIGNAC M.A. — Appréciation de l'activité protéolytique de la microflore du sol. - Ann. Inst. Pasteur, 1956, 90, 359-361.
- LASSEUR Ph., DUPAIX A. & MAGUITOT C. — Application du phénomène de Boutaric à la préparation des solutions colorantes. - Trav. Lab. Microbiol. Fac. Pharmac. Nancy, 1931, 4, 121-132.
- LEDOUX L. & HUART R. — Integration and replication of DNA of Micrococcus lysodeikticus in DNA of germinating barley. - Nature, 1968, 218, 1256-1259.
- LEDOUX L. & HUART R. — Fate of exogenous bacterial desoxyribonucleic acids in barley seedling. - J. Molec. Biol., 1969, 43, 243-262.
- LEELAVATHY K.M. — Amino-acids and sugars in the exudates from germinating seeds of rice. - Proc. Indian Acad. Sci., B, India, 1970, 72, 81-90.
- LETHAM D.S. — Chemistry and physiology of kinetin-like compounds. - Annu. Rev. Plant Physiol., 1967, 18, 349-364.
- LETHAM D.S. — Cytokinins and their relation to the other phytohormones. BioScience, 1969, 19, 309-316.
- LEVAL J. & REMACLE J. — A microbiological study of the rhizosphere of poplar. - Plant and Soil., 1969, 31, 31-47.
- LINSKENS H.F. & KNAPP R. — Über die Ausscheidung von Aminosäuren in reinen und gemischten Beständen verschiedener Pflanzenarten. - Planta., 1955, 45, 106-117.
- LOCHHEAD A.G. — Soil microbiology. - Ann. Rev. Microbiol., 1952, 6, 185.

- LOCHHEAD A.G. — Qualitative studies of soil microorganisms : XV : capability of the predominant bacterial flora for synthesis of various growth factors. - Soil. Sci., 1957, 84, 395-403.
- LOCHHEAD A.G. & BURTON M.O. — Incidence in soil of bacteria requiring vitamine B₁₂ and the terregens factor. - Soil. Sci., 1956, 82, 233-245.
- LOCHHEAD A.G. & CHASE F.E. — Qualitative studies of soil micro-organisms. V. Nutritional requirements of the predominant bacterial flora. - Soil. Sci., 1943, 55, 185-195.
- LOCHHEAD A.G. & ROUATT J.W. — The "rhizosphere effect" on the nutritional groups of soil bacteria. - Proc. Soil. Soc. Ann., 1955, 19, 48-49.
- LOCHHEAD A.G. & THEXTON R.H. — Qualitative studies of soil micro-organisms. VII The rhizosphere effect in relation to the amino acid nutrition of bacteria. - Canad. Jour. Res., 1947, 25, 20-26.
- LUNDEGARDH H. & STENLID G. — On the exudation of nucleotides and flavavones from living roots. - Arkiv. for Bot., 1944, 31, 1-27.
- MACURA J. — Seed and soil bacteria in relation to the rhizosphere effect. - Fol. Biol., 1958, 4, 274-280.
- MACURA J. — Interactions nutritionnelles plantes-bactéries et bases expérimentales de la bactérisation des graines. - Ann. Inst. Pasteur, Paris, 1966, 111, 9-38.
- MANGUM J.H., MURRAY B.K. & NORTH J.A. — Vitamin B₁₂ dependent methionine biosynthesis in cultured mammalian cells. - Biochemistry, 1969, 8, 3496-3499.
- MARTIN P. — Qualitative und quantitative Untersuchungen über die Ausscheidung organischer Verbindungen auss den Keimwurzeln des Hafers (Avena sativa L.). - Naturwiss., 1956, 43, 227-228.
- MARTIN P. — Die Abgabe von organischen Verbindungen insbesondere von scopoletin aus den Keimwurzeln des Hafers. - Zeitsch. Bot., 1957, 45, 475-506.
- MATSUBARA S., ARMSTRONG D.J. & SKOOG F. — Cytokinins in t-RNA of Corynebacterium fascians. - Plant Physiol., 1968, 43, 451-453.

- MEUNIER R. & SIMON P. — Essai d'identification de deux souches d'Arthrobacter par l'étude de deux caractères antigéniques et de leur résistance aux antibiotiques. - Ann. Inst. Pasteur, 1963, 105, 275-281.
- MICHL H. — Uber den nachweis von purinderivaten auf filtrierpapier. - Naturwiss., 1953, 40, p. 390.
- MILLER C.O. — Zeatin and zeatin riboside from a mycorrhizal fungus. - Science, 1967, 157, 1055-1057.
- MILLER R.H. & CHAU T.J. — The influence of soil micro-organisms on the growth and chemical composition of soybean. - Plant and Soil., 1970, 32, 146-160.
- MILLER R.H. & SCHMIDT E.L. — A technique for maintaining a sterile soil. Plant root environment, and its application to the study of amino acids in the rhizosphere. - Soil. Sci., 1965, 100, 267-273.
- MIMS V. & LASKOWSKI M. — Studies on vitamin B₆ conjugase from chicken pancreas. - J. Biol. Chem., 1945, 160, 493-503.
- MITCHELL R. & HURWITZ E. — Suppression of Phytium by lytic rhizosphere bacteria. - Phytopath., 1965, 55, 156-158.
- MOLLIARD M. — Sur la sécrétion par les racines de substances toxiques pour la plante. - Bull. Soc. Bot. Fr., 1913, 80, 442-446.
- MOTHES K. — Physiology of alkaloids. - Ann. Rev. Plant Physiol., 1955, 6, 393-432.
- MUDD S.H., LEVY H.L. & ABELES R.H. — A derangement in B₁₂ metabolism leading to homocystinemia, cystathioninemia and methylmalonic aciduria. - Biochem. Biophys. Res. Commun., 1969, 35, 121-126.
- MULDER E.G. & ANTHEUNISSE J. — Morphologie, physiologie et écologie des Arthrobacter. - Ann. Inst. Pasteur, 1963, 105, 46-74.
- MULDER E.G., ADAMSE A.D., ANTHEUNISSE J., DEINEMA H., WOLDENDORP J.W. & ZEVENHUIZEN L.P.T.M. — The relationship between Brevibacterium linens and bacteria of the genus Arthrobacter. - J. Appl. Bact., 1966, 29, 44-71.
- MULLAKHANBHAI M.F. & BHAT J.V. — Description of two new ureolytic Arthrobacter species isolated from soil and sewage. - J. Indian Inst. Sci., 1966, 48, 25-37.

- MULLAKHANBHAI M.F. & BHAT J.V. — Vitamins and nitrogen requirements of Arthrobacter species. - J. Indian Inst. Sci., 1966, 48, 142-156.
- MULLAKHANBHAI M.F. & BHAT J.V. — A numerical taxonomical study of Arthrobacter. - Curr. Sci. India, 1967, 36, 115-118.
- MURASHIGE T. & SKOOG F. — A revised Medium for rapid growth and Bio Assays with tobacco tissue cultures. - Physiol. Plantarum., 1962, 15, 473-497.
- NARA T., MISAWA M., KOMURO T. & KINOSHITA S. — Production of nucleic acid related substances by fermentative processes. XII. Accumulation of inosinic acid by Micrococcus sodonensis and Arthrobacter citreus. - Agric. Biol. Chem., 1967, 31, 1224-1232.
- NEAL J.L., ATKINSON J.R.T.G. & LARSON R.I. — Changes in the rhizosphere microflora of spring wheat induced by disomic substitution of a chromosome. - Canad. J. Micr., 1970, 16, 153-158.
- NICHIK M.M. — Influence des metabolites sur l'excrétion de quelques vitamines du groupe B par les racines de pois et de Colza (en russe). - Fiziol. Bioklim. Kul'tur Rasten, 1970, 2, 324-327.
- NIELSEN N. & HOLMSTROM B. — On the occurrence of folic acid, folic acid conjugates and folic acid conjugases in pollen. - Acta. Chem. Scand., 1957, 11, 101-104.
- NORONHA J.M. & SILVERMAN M. — Distribution of folic acid derivatives in natural material. I. chicken liver folates. - J. Biol. Chem., 1962, 237, 3299-3302.
- NORONHA J.M. & ABOOBAKER V.S. — Studies on the folate compounds of human blood. - Arch. Biochem. Biophys., 1963, 101, 445-447.
- OGUNMODEDE B.K. & OYENUGA V.A. — Vitamin B content of cowpeas (Vigna unguiculata Walp) II. Pyridoxine, pantothenic acid, biotin and folic acid. - J. Sci. Fd. Agric., 1970, 21, 87-90.
- OKABAYASHI T. — Occurrence of nucleotides in culture fluids of microorganisms. - J. Bacteriol., 1962, 84, 1-8.
- OWENS J.D. & KEDDIE R.M. — The nitrogen nutrition of soil and herbage coryneform bacteria. - J. Appl. Bact., 1969, 32, 338-347.
- PARKINSON D. — Liberation of amino-acids by oat seedlings. - Nature, 1955, 176, 35-36.

- PARKINSON D., TAYLOR G.S. & PEARSON R. — Studies on fungi in the root region. I. the development of fungi on young roots. - *Plant and Soil*, 1963, 19, 332-349.
- PARKINSON D. — *Soil Micro-organisms and Plant Roots*. - *Soil Biology*, Academic Press, London, 1967, 449-478.
- PAUL E.A. & SCHMIDT E.L. — Formation of free amino acids in rhizosphere and nonrhizosphere soil. - *Soil Sci. Soc. Am. Proc.*, 1961, 25, 359-362.
- PEARSON R. & PARKINSON D. — The site of excretion of ninhydrine - positive substances by broad-bean seedlings. - *Plant and Soil*, 1961, 13, 391-396.
- PEELER H.T., YACOWITZ H., CARLSON C.W., MILLER R.F., NORRIS L.C. & HEUSER G.F. — Studies on the vitamin B₁₂ content of feedstuffs and others materials. - *Jour. Nutrition*, 1951, 43, 49-61.
- PERALTA F. & DE ESTIOKO R.P. — A tentative study of the effect of root excretion of common paddy weeds upon the crop production of lowland rice. - *Philippines Agr.*, 1923, 11, 205-216.
- PETERSON E.A., ROUATT J.W. & KATZNELSON H. — Microorganisms in the root zone in relation to soil moisture. - *Can. J. Microbiol.*, 1965, 11, 483-489.
- PETERSON E.A. & ROUATT J.W. — Soil microorganisms associated with flax roots. - *Can. J. Microbiol.*, 1967, 13, 199-203.
- PETRENKO M.B. — Aptitude des bactéries de la rhizosphère à synthétiser les vitamines du groupe B, comme l'un des facteurs déterminant leur influence sur le développement des pousses de maïs (en ukrainien). - *Mikrobiol. Zh.*, 1968, 30, 439-443.
- PETRU Z.A. & CHRASTIL J. — The exosmosis of flavone from root explantations of Arachis hypogaea L. - *Folio Biol.*, 1955, 1, 310-312.
- PFAU A., KALLISTRATOS G. & OSSOWSKI B. — Leitisotopenuntersuchungen zur Aufnahme des vitamin B₁₂ über die Wurzeln der Vicia faba. - *Atompraxis*, 1962, 8, 392-398.
- PHILLIPS D.A. & TORREY J.G. — Cytokinin production by Rhizobium japonicum. - *Physiol. Plant.*, 1970, 23, 1057-1063.

- PICCI G. — Dosaggio microbiologico di alcune vitamine e di alcuni aminoacidi ceduti dal seme durante la germinazione. - Ann. Fac. Agrar. Univ. Pisa., 1959, 20, 51-60.
- PILET P.E. — Dosage photolorimétrique de l'acide β -indolyl-acétique : application à l'étude des auxine-oxydases. - Revue Générale de Botanique, 1957, 64, 106.- 112.
- POCHON J. — Manuel technique d'analyse microbiologique du sol. - Masson, Paris, 1954, 123 p.
- POCHON J. — Interactions entre les microorganismes telluriques et les plantes. - Microbiol. Esp., 1963, 16, 117-122.
- POCHON J. & DE BARJAC H. — Traité de Microbiologie des Sols. - Dunod - Paris, 1958, 685.
- POCHON J. & DE BARJAC H. — Interactions entre la croissance des Azotobacter et celle du maïs. - Ann. Inst. Pasteur, 1958, 94, 419-427.
- POCHON J., ROCHE A., CHARPENTIER M. & TARDIEUX P. — Effet rhizosphérique du maïs (*Zea Mays* L.) en culture hydroponique aux premiers stades de croissance I. Groupements bactériens physiologiques. - Trans. 7th. Intern. Congr. Soil Sci., 1960, 3, 558-561.
- PORTER J.W.G. — Occurrence and biosynthesis of analogues of vitamin B₁₂ Vitamin B₁₂ und Intrinsic Factor, Stuttgart, 1957, 43-55.
- RABONOWITZ J.C. & HIMES R.H. — Folic acid coenzymes. - Fed. Proc., 1960, 19, 963-970.
- RATNER E.I. & SAMOJLOVA S.A. — L'activité phosphatasique extracellulaire dans les racines (en russe). - Fiziol. Rasten., 1955, 2, 30-41.
- REINERT J. & WHITE P.R. — The cultivation in vitro of tumor tissues and normal tissues of Picea glauca. - Physiol. Plant., 1956, 9, 177-189.
- REMPE J.K. & KALTAGOVA O.G. — Influence of root microflora on the increase, development and activity of physiological processes in plants. - Plant Microbes Relationships, Proc. Symp., Prague, 1963, 178-185.
- RICHTER M., WILMS W. & SCHEFFER F. — Determination of root exudate in a sterile continuous flow culture. II Short-term and long-term variations of exudation intensity. - Plant. Physiol., 1968, 43, 1747-1754.
- RIVIERE J. — Contribution à l'étude de la rhizosphère du Blé. - Thèse, Fac. Sci. Paris, 1959, 245 p.

- RIVIERE J. — Etude microbiologique de la rhizosphère du blé. III. Nature des excréctions radicellaires du blé à la fin du tallage. - Ann. Inst. Pasteur, 1960, 98, 313-316.
- RIVIERE J. — Action des microorganismes de la rhizosphère sur la croissance du blé. I. Répartition des genres et des groupes nutritionnels. - Ann. Inst. Pasteur, 1961, 101, 611-618.
- RIVIERE J., FROUARD Y. & CATROUX G. — Influence d'enfouissements repetés de tiges de maïs sur la microflore bactérienne des sols. - Ann. Agron., 1970, 21, 403-420.
- ROHATGI K., BANERJEE M. & BANERJEE S. — Effect of germination on vitamin B₁₂ values of pulses. - J. Nutrition, 1955, 56, 403-408.
- ROHRINGER R., KIM W.K. & SAMBORSKI D.J. — Folate derivatives in healthy and rust infected primary leaves of wheat. - Can. J. Biochem. 1969, 47, 1161-1170.
- ROMANOW I., CHALVIGNAC M.A. & POCHON J. — Recherches sur la production d'une substance cytokinique par Agrobacterium tumefaciens (Smith et Town) Conn. - Ann. Inst. Pasteur, Paris, 1969, 117, 58-63.
- ROOS A.J., SPRONK A.M. & COSSINS E.A. — 5-methyltetrahydrofolic acid and other folate derivatives in germinating pea seedlings. - Can. J. Biochem., 1968, 46, 1533-1535.
- ROSENBERG L.E., LILLIJEQUIST A.L., HSIA Y.E. & ROSENBLOOM I.M. — Vitamin B₁₂ dependent methylmalonicaciduria : defective B₁₂ metabolism in cultured fibroblasts. - Biochem. Biophys. Res. Commun., 1969, 37, 607-615.
- ROUATT J.W. — Initiation of the rhizosphere effect. - Canad. J. Microbiol., 1959, 5, 67-71.
- ROUATT J.W. & LOCHHEAD A.G. — Qualitative studies of soil microorganisms : XIII. effect of decomposition of various cropplants on the nutritional groups of soil bacteria. - Soil Sci., 1955, 80, 147-154.
- ROUATT J.W. & KATZNELSON H.A. — A study of the bacteria on the root surface and in the rhizosphere soil of crop plants. - J. Appl. Bact., 1961, 24, 164-171.
- ROULET M.A. & SCHOPFER W.H. — Les vitamines du sol et leur signification. - Trans. Intern. Congr. Soil. Sci. 4th Congr., Amsterdam, 1950, 1, 202-203.

- ROVIRA A.D. — Plant root excretions in relation to the rhizosphere effect. I. The nature of root exudate from oats and peas. - *Plant and Soil*, 1956, 7, 178-194.
- ROVIRA A.D. — A study of the development of the root surface microflora during the initial stages of plant growth. - *J. appl. Bact.*, 1956, 19, 72-79.
- ROVIRA A.D. — Root excretions in relation to the rhizosphere effect. IV. influence of plant species, age of plants, light, temperature and calcium nutrition on exudation. - *Plant and soil.*, 1959, 11, 53-64.
- ROVIRA A.D. — Effects of Azotobacter, Bacillus and Clostridium on the growth of wheat. - *Plant Microbes relationships, Proc. Symp.*, Prague 1963, 193-200.
- ROVIRA A.D. — Diffusion of carbon compounds away from wheat roots. - *Austral. J. Biol. Sci.*, 1969, 22, 1287-1290.
- ROVIRA A.D. — Plant root exudates. - *Bot. Rev.*, 1969, 35-57.
- ROVIRA A.D. & BOWEN G.D. — Effect of microorganisms on the development of roots and root hairs subterranean clover. - *Nature*, 1960, 185 260-261.
- ROVIRA A.D. & BOWEN G.D. — Phosphate incorporation by sterile and non-sterile plant roots. - *Austral. J. Biol. Sci.*, 1966, 19, 1167-1169.
- ROVIRA A.D. & HARRIS J.R. — Plant root excretions in relation to the rhizosphere effect. V. The exudation of B-group vitamins. - *Plant and soil*, 1961, 14, 199-214.
- ROVIRA A.D. & Mc DOUGALL B. — Microbiological and biochemical aspects of the rhizosphere. - *Soil. Biochemistry*. Marcel Dekker, New York 1967, 417-463.
- SADASIVAN T.S. — The problem of rhizosphere microfloras. - *Proc. Natn. Inst. Sci.*, India, 1960, 26B, 71-79.
- SADHU M.K. & DAS T.M. — Amino acids liberated by growing rice seedlings. - *Bull. Botan. Soc. Bengal*, 1968, 22, 219-220.
- SALONIUS P.O., ROBINSON J.B. & CHASE F.E. — The mutual growth of Arthrobacter globiformis and Pseudomonas fluorescens in gamma sterilized soil. - *Plant and Soil*, 1970, 32, 316-326.

- SANDS D.C. & ROVIRA A.D. — Pseudomonas fluorescens Biotype G, the dominant fluorescent Pseudomonad in South Australian soils and wheat rhizospheres. - J. Appl. Bacteriol., 1971, 34, 261-275.
- SAUBERLICH H.E. — Comparative studies with the natural and synthetic citrovorum factor. - J. Biol. Chem., 1952, 195, 337-348.
- SCANDURRA R., BARBONI G. & POLITI V. — Chromatographic separation of cobalamins. - Acta Vitaminol. et Enzymol., 1969, 23, 92-96.
- SCHERTEL M.E., BOEHNE J.W. & LIBBY D.A. — Folic acid derivatives in yeast. - J. Biol. Chem., 1965, 240, 3154-3158.
- SCHROTH M.N. & SNYDER W.C. — Effect of host exudates of chlamydospore germination of the bean root rot fungus, Fusarium solani f. phaseoli. Phytopath., 1961, 51, 389.
- SCHROTH M.N., WEINHOLD A.R. & HAYMAN D.S. — The effect of temperature on quantitative differences in exudates from germinating seeds of bean, pea, and cotton. - Canad. J. Bot., 1966, 44, 1429-1432.
- SENGUPTA U.K. & COSSINS E.A. — Pteroylglutamate derivatives in the roots of Pisum sativum. - Phytochemistry, 1971, 10, 1723-1732.
- SHAW W.H.C. & BESSEL C.J. — The determination of vitamin B₁₂ - a critical review - The analyst., 1960, 85, 389-409.
- SHERROD L.L. & DOMSCH K.H. — Amino acids in exudates of healthy and fungus affected pea roots. - Arch. Mikrobiol., 1970, 70, 240-242.
- SINGH R. — Excretion of amino-acids by plant roots. - Curr. Sci. India 1967, 36, 236-237.
- SIROTNAK F.M., DONATI G.J. & HUTCHISON D.J. — Folic acid derivatives synthesized during growth of Diplococcus pneumoniae. - J. Bacteriol. 1963, 85, n° 3, 658-665.
- SKEEGGS H.R. — Microbiological assay of vitamin B₁₂. - Methods Biochem. Anal., 1966, 14, 53-62.
- SKENE K.G.M. — Gibberellin-like substances in root exudate of Vitis vinifera. - Planta, 1967, 74, 250-262.
- SKENE K.G.M. & KERRIDGE G.H. — Effect of root temperature on cytokinin activity in root exudate of Vitis vinifera L. - Plant Physiol., 1967, 42, 1131-1139.

- SKYRING G.W. & QUADLING C. — Soil bacteria : comparisons of rhizosphere and non rhizosphere populations. - Can. J. Microbiol., 1969, 15, 473-488.
- SKYRING G.W. & QUADLING C. — Soil bacteria : a principal component analysis and guanine-cytosine contents of some arthrobacter-coryneform soil isolates and of some named cultures. - Can. J. Microbiol., 1970, 16, 95-107.
- SLANKIS V., RUNECKLES V.C. & KROTKOV G. — Metabolites liberated by roots of white pine (Pinus strobus L.) seedling. - Plant and Soil., 1964, 17, 301-313.
- SMALIJ V.T. — Influence des sécrétions des racines de blé sur le développement des bactéries de la rhizosphère (en ukrainien) - Mikrobiol. Zh. Ukrain., 1960, 22, 13-21.
- SMALIJ V.T. — Accumulation de vitamines (biotine-thiamine) dans la rhizosphère du blé d'hiver (en ukrainien). - Mikrobiol. Zh., 1963, 25, 6-10.
- SMALIJ V.T. — Accumulation de vitamines (acide nicotinique et pantothénique) dans la rhizosphère du blé d'hiver. (en ukrainien). - Mikrobiol. Zh. 1964, 26, 9-13.
- SIEBURTH J. McN. — Inhibition and agglutination of Arthrobacter by Pseudomonas. - J. Bacteriol., 1967, 93, 1911-1916.
- SKOOG F., HAMZI H.Q., SZWEYKOWSKA A.M., LEONARD N.J., CARRAWAY K.L., FUJII T., HELGESON J.P. & LOEPPKY R. — Cytokinins : Structure, Activity relationships. - Phytochemistry, 1967, 6, 1169-1192.
- SOBIESZCZANSKI J. — Role of microorganisms in life of cultivated plants I. quantitative and qualitative changes in the microflora of the rhizosphere of rye and winter vetch during the vegetation period. - Acta Microbiol. Polon., 1965, 14, 161-182.
- SOBIESZCZANSKI J. — Role of microorganisms in life of cultivated plants. II. Effet of microorganisms from the rye and vetch rhizosphere and from root free soil on the development of plants. - Acta Microbiol. Polon., 1965, 14, 183-202.
- SOBIESZCZANSKI J. — Studies on the role of microorganisms in the life of cultivated plants. III origine of the bacterial substances stimulating the growth of plants. - Acta Microbiol. Polon., 1966, 15, 67-84.

- SOROKINA T.A. — The specificity of the microflora complex of the plant root system. - Plant Microbes Relationships, Proc. Synp., Prague, 1963 42-47.
- SOTOBAYASHI H., ROSEN F. & NICHOL A. — Tetrahydrofolate cofactors in tissues sensitive and refractory to amethopterin. - Biochemistry., 1961, 5, 3878-3883.
- SOULIDES D.A. & CLARK F.E. — Nitrification in grassland soils. - Soil. Sci. Soc. Amer. Proc., 1958, 22, 308-311.
- SOUWARE S. — Etude de la specificité des microfiores rhizosphériques. - D.E.A. Biologie Végétale, Lille, 1970.
- SPERBER J.I. & ROVIRA A.D. — A study of the bacteria associated with the roots of subterranean clover and wimmera rye-grass. - J. Appl. Bact., 1959, 22, 85-95.
- STADTMAN T.C. — Vitamin B₁₂ - Biochemical studies elucidate the role of this complex molecule in diverse metabolic processes. - Science, 1971, 171, 859-867.
- STARKEY R.L. — Some influences of the development of higher plants upon the microorganisms in the soil. VI. Microscopic examination of the rhizosphere. - Soil. Sci., 1938, 45, 207.- 249.
- STOLP H. — Beitrage zur Frage der Beziehungen zwischen Mikroorganismen und höheren Pflanzen. - Arch. Mikrobiol., 1952, 17, 1-29.
- STOTSKY G., CULBRETH W. & MISH C.B. — Apparatus for growing plants with aseptically cut roots for collection of root exudates and CO₂. - Plant Physiol., 1962, 37, 332-341.
- STROUN M., ANKER P. & AUDERSET G. — Natural release of nucleic acids from bacteria into plant cells. - Nature, 1970, 227, 607-608.
- STROUN M., ANKER P., CATTANEO A. & ROSSIER A. — Effect of the extent of DNA transcription of plant cells and bacteria on the transcription in plant cells of DNA released from bacteria. - Febs Letters, 1971, 13, 161-164.
- STRZELCZYK E. — Studies on the incidence of certain "nutritional" and physiological groups of bacteria in rhizosphere and nonrhizosphere soil. - Acta Microbiol. Polon., 1961, 10, 169-180.
- SUBBA-RAO N.S. & BAILEY D.L. — Rhizosphere studies in relation to varietal resistance of susceptibility of tomato to Verticillium wilt. - Can. J. Bot., 1961, 39, 1747-1758.

- SULOCHANA C.B. — Amino acids in root exudates of cotton. - Plant and soil., 1962, 16, 312-326.
- SULOCHANA C.B. — B vitamins in root exudates of cotton. Plant and Soil, 1962, 16, 327-334.
- SULOCHANA C.B. — Cotton roots and vitamin requiring and amino-acid requiring bacteria. - Plant and Soil., 1962, 16, 335-346.
- SWENDSEID M.E. & NYC J.F. — Study of folic acid derivatives in Neurospora crassa and the recognition of a mutant resistant to aminopterin. - J. Bacteriol., 1958, 75, 654-659.
- SZEMBER A. — Providing aseptically cultivated plants with water through bacteria tight glass-filters. - Plant and Soil, 1959, 11, 392-394.
- TARDIEUX P., LAJUDIE J. & CHALVIGNAC M.A. — Effet rhizosphérique du maïs (Zea Mays L.) en culture hydroponique aux premiers stades de croissance. II/ Morphologie des bactéries et types nutritionnels. - Trans. 7th Intern. Congr. Soil Sci., 1960, 3, 562-567.
- TARDIEUX P., CHALVIGNAC M.A., CHARPENTIER M., LAJUDIE J., TARDIEUX A. & POCHON J. — Interactions microorganismes-maïs en culture hydroponique aux premiers stades de croissance. - Ann. Inst. Pasteur 1961, 100, 243-247.
- TAYLOR C.B. — The nutritional requirements of the predominant bacterial flora of the soil. - Proc. Soc. Applic. Bact., 1951, 14, 101-111.
- TESAR S. & KUTACEK M. — Root excretion of higher plants. Excretion of amino acids by roots of wheat in water culture. - Ann. Czechoslov. Acad. Agr. Sci., 1955, 28, 927-940.
- THERON J.J. — The influence of plants on the mineralization of nitrogen and the maintenance of organic matter in the soil. - J. Agr. Sci., 1951, 41, 289-296.
- THIMANN K.V. & SACHS T. — The role of cytokinins in the "fasciation" disease caused by Corynebacterium fascians. - Amer. J. Bot., 1966, 53, 731-739.
- TIMONIN M.I. — The interaction of higher plants and soil micro-organisms I. Microbial population of rhizosphere of seedlings of certain cultivated plants. - Canad. J. Res., 1940, 18, 307-317.

- TIMONIN M.I. — Rhizosphere effect of healthy and diseased lodgepole pine seedlings. - Can. J. Microbiol., 1966, 12, 531-537.
- TORTOLANI G., BIANCHINI P. & MANTOVANI V. — Separation and determination of cobalamins on an SP Sephadex column. - J. Chromatog., 1970, 53, 577-579.
- TROLL W. & CANNAN R.K. — A modified photometric ninhydrin method for the analysis of amino and imino acids. - J. Biol. Chem., 1953, 200, 803-811.
- ULJASHOVA R.M. — La composition spécifique de la microflore en culture hydroponique et en terre, de la tomate (en russe). Mikrobiologiya, 1966, 35, 871-877.
- UPPER C.D., HELGESON J.P., KEMP J.D. & SCHMIDT C.J. — Gas-liquid chromatographic isolation of cytokinins from natural sources 6-(3-methyl-2-butenylamino) purine from Agrobacterium tumefaciens. - Plant Physiol., 1970, 45, 543-547.
- VAGNEROVA K. & VANCURA V. — Production and utilisation of aminoacids by various species of rhizosphere bacteria. - Fol. Microbiol., 1962, 7, 55-60.
- VAGNEROVA K. — Properties of seed and soil bacteria with reference to the colonisation of roots by microorganisms. - Plant Microbes Relationships, Proc. Symp., Prague, 1963, 34-41.
- VALENCIA R. — Quelques aspects de la synthèse microbiologique des cobalamines et de la vitamine B₁₂. - Ann. Nutrit. Aliment. Fr., 1965, 19, 679-687.
- VANCURA V. — Root exudates of plants. I. Analysis of root exudates of barley and wheat in their initial phase of growth. - Plant and Soil, 1964, 21, 231-248.
- VANCURA V. & GARCIA J.L. — Root exudates of reversibly wilted millet plants (Panicum miliaceum L.) - Oecol. Plant., 1969, 4, 93-98.
- VANCURA V. & HOVADIK A. — Composition of root exudates in the course of plant development. - Plant Microbes Relationships, Proc. Symp., Prague, 1963, 21-25.
- VANCURA V. & HOVADIK A. — Root exudates of plants. II. Composition of root exudates of some vegetables. - Plant and Soil, 1965, 22, 21-32.
- VAN ETTEN C.H., MILLER R.W., WOLFF I.A. & JONES Q. — Amino acid composition of seeds from 200 angiospermous plant species. - J. Agric. Food Chem., 1963, 11, 399-410.

- VASANTHARAJAN V.N. & BHAT J.V. — Interrelations between soil microorganisms and mulberry. I. Phytohormone production by soil and rhizosphere bacteria and their effect on plant growth. - *Plant and Soil.*, 1967, 27, 261-272.
- VELDKAMP H. — Saprophytic coryneform bacteria. - *Annu. Rev. Microbiol.*, 1970, 24, 209-240.
- VERONA O. — Interaction entre la graine en germination et les microorganismes telluriques. - *Ann. Inst. Pasteur*, 1963, 105, 75-98.
- VERONA O., GAMBOGI P. & MAZZANTI P. — Ricerche sulla rizosfera di *Vicia faba* L. - *Agric. Ital.*, 1966, 66, 28-44.
- VIRTANEN A.I. & LAINE T. — Chemical nature of the amino-acids excreted by leguminous root nodules. - *Nature*, 1935, 136, 756-757.
- VIRTANEN A.I., LAINE T. & HANSEN S. — Excretion of amino-acids from the roots nodules of leguminous plants. - *Nature*, 1936, 197, 277.
- VRANY J., VANCURA V. & MACURA J. — The effect of foliar application of some readily metabolized substances, growth regulators and antibiotics on rhizosphere microflora. - *Folia Microbiol.*, Praha, 1962, 7, 61-70.
- WALLACE R.H. & KING H. de L. — Nutritional groups of soil bacteria on the roots of barley and oats. - *Soil Sci. Soc. Amer. Proc.*, 1954, 18, 282-285.
- WEISSBACH H., LADD J.N., VOLCANI B.E., SMYTH R.D. & BARKER H.A. Structure of the adenylcobamide coenzyme : degradation by cyanide, acid, and light. - *J. Biol. Chem.*, 1960, 235, 1462-1473.
- WELTE E. & TROLLDENIER G. — Effect of soil microflora and seed microflora on the growth of plants. - *Plant Microbes Relationships, Proc. Symp.*, Prague, 1963, 186-192.
- WEST P.M. — Excretion of thiamine and biotin by the roots of higher plants. - *Nature*, 1939, 144, 1050-1051.
- WHITE P.J. & WOODS D.D. — The synthesis of p-aminobenzoic acid and folic acid by staphylococci sensitive and resistant to sulphonamides. - *J. Gen. Microbiol.*, 1965, 40, 243-253.
- WIELAND O.P., HUTCHINGS B.L. & WILLIAMS J.H. — Studies on the natural occurrence of folic acid and the Citrovorum Factor. - *Arch. Biochem. Biophys.*, 1952, 40, 205-217.

- WITTENBERG J.B., NORONHA J.M. & SILVERMAN M. — Folic acid derivatives in the gas gland of Physalia physalis L. - Biochem. J., 1962, 85, 9-15.
- WOLDENDORP J.W. — The quantitative influence of the rhizosphere on denitrification. - Plant and Soil., 1962, 17, 267-270.
- WRIGHT B.E. — Poly-glutamyl pteridine coenzymes. - J. Amer. Chem. Soc., 1955, 77, 3930-3932.
- WRIGHT B.E. — Folic acid coenzyme forms and function. - Proc. 4th Int. Congr. Biochem. Vienna, 1958, 11, 266-285.
- YOSHIDA R., ORITANI T. & NISHI A. — Studies on nitrogen metabolism in crop plants. VIII. Occurrence of kinetin-like factor in root exudate of rice plants. - Proc. Crop. Sci. Soc., 1970, 39, 363-369.
- YOSHIDA R., ORITANI T. & NISHI A. — Kinetin-like factors in the root exudate of rice plants. - Plant Cell Physiol., 1971, 12, 89-94.
- YU C.T. & ZAMECNIK P.C. — A hydrolytic procedure for ribonucleosides and its possible application to the sequential degradation of RNA. - Biochim. Biophys. Acta., 1960, 45, 148-154.
- ZAGALLO A.C. & KATZNELSON H. — Metabolic activity of bacterial isolates from wheat rhizosphere and control soil. - J. Bacteriol., 1957, 73, 760-764.
- ZAKRZEWSKI S.F. & NICHOL C.A. — Derivatives of pteric and pteroyl-glutamic acids formed by Streptococcus faecalis. - Federation Proc., 1955, 14, 311.
- ZAKRZEWSKI S.F. — Evidence for the chemical interaction between 2-mercaptoethanol and tetrahydrofolate. - J. Biol. Chem., 1966, 241, 2957-2961.

au Colza puisqu'elle peut être généralisée pour d'autres plantes, de familles très diverses. Cependant, elle est probablement en rapport avec le spectre bactérien propre des microflore telluriques employées dont la teneur en Arthrobacter est déjà relativement élevée.

Cette microflore rhizosphérique est capable de synthétiser des facteurs de croissance de type vitaminique, et une attention particulière a été portée sur la production de vitamine B₁₂, dont la présence dans la rhizosphère a été démontrée. Cette cyanocobalamine peut être absorbée par le système racinaire des plantules, et il a été possible, par dosages biologiques, de la mettre en évidence dans les tissus des végétaux sains. Son rôle dans l'équilibre de la microflore dans le sol ou dans le métabolisme des tissus végétaux a été analysé.

A propos d'un autre type de vitamines : les composés foliques, la microflore rhizosphérique intervient aussi, mais cette fois d'une façon différente, en libérant, par voie enzymatique, les formes libres de l'acide folique à partir des composés conjugués excrétés par le Colza. Une étude biochimique de ces formes conjuguées, quantitativement très importantes chez le Colza, a d'ailleurs permis de détecter simultanément la présence de dérivés formylés et méthylés des pteroylglutamates.

Enfin, cette microflore rhizosphérique, et les Arthrobacter en particulier, synthétisent des substances phytohormonales dont l'une, de type cytokinine, a été décelée grâce à son action sur le système racinaire du Colza qui, en sa présence, présente une dichotomie très prononcée et une prolifération abondante de poils absorbants. Après isolement et purification de cette cytokinine produite dans les milieux de culture des Arthrobacter, son étude chimique prouve qu'elle est différente des cytokinines actuellement connues et produites dans les milieux de culture de certaines bactéries phytopathogènes ou symbiotiques.

Ces quelques exemples d'interactions entre les plantes et les microorganismes s'ajoutant aux résultats déjà connus prouvent l'importance que peut avoir la microflore rhizosphérique, soit dans la symbiose avec les plantes, soit dans l'équilibre microbiologique des sols.

2ème PARTIE : LA MICROFLORE RHIZOSPHERIQUE DES PLANTULES
DE COLZA - ACTIVITE BIOLOGIQUE ET SPECTRE BACTERIEN 65

A - L'activité biologique de la microflore rhizosphérique du Colza.	66
Comparaison avec la rhizosphère des autres plantes.	77
B - Le spectre bactérien de la microflore rhizosphérique du Colza .	81
1 - Caractéristiques des bactéries du genre <u>Arthrobacter</u> présentes dans la rhizosphère du Colza .	81
2 - Etude comparée du spectre bactérien de la rhizosphère du Colza et de quelques autres plantules.	93
3 - Discussion générale et conclusion.	102

3ème PARTIE : ETUDE PARTICULIERE DE LA PRESENCE ET DU ROLE
DE LA VITAMINE B₁₂ DANS LA RHIZOSPHERE DU COLZA. 106

A - Mise en évidence de la production de vitamine B ₁₂ par la micro- flore rhizosphérique des plantules de Colza.	109
B - La teneur en vitamine B ₁₂ des végétaux supérieurs .	115
C - Discussion sur la présence de la vitamine B ₁₂ dans les tissus végétaux.	120
1 - Cas des tissus végétaux provenant de cultures non stériles.	120
2 - Cas des tissus végétaux provenant de cultures stériles.	121
a) expérimentation basée sur l'utilisation de ⁵⁸ CoCl ₂ .	122
b) expérimentation basée sur l'utilisation d'une culture tissulaire .	124
c) conclusion.	127
Conclusion générale	129

4ème PARTIE : ETUDE PARTICULIERE DE LA NATURE DES COMPOSES
FOLIQUES PRESENTS DANS LA RHIZOSPHERE DU COLZA 131

A - Etude des composés foliques présents dans la rhizosphère et leur évolution.	133
--	-----

B - Comparaison des folates présents dans la plantule de Colza et dans ses exsudats.	138
1 - Techniques employées.	139
2 - Résultats expérimentaux.	144
3 - Discussion générale des résultats et conclusion.	155
5ème PARTIE : ETUDE PARTICULIERE DE LA PRODUCTION D'UNE SUBSTANCE DE TYPE CYTOKININE PAR LES ARTHROBACTER	
A - Production d'une substance de type cytokinine par des Arthrobacter d'origine rhizosphérique.	159
B - Etude de la nature chimique de la cytokinine synthétisée par les Arthrobacter.	166
1 - Mise au point d'une nouvelle méthode d'isolement et de purification de la cytokinine à partir des milieux de culture.	166
2 - Analyse de la cytokinine.	170
Discussion générale et conclusion.	174
CONCLUSIONS GENERALES.	176
BIBLIOGRAPHIE.	180
RESUME.	208