

## Exercice – Les nodosités

### 1) Croissance des Légumineuses et bactéries du sol

#### Étude 1

Des lupins (*Lupinus luteus* cultivar Sulfa), Fabacées légumineuses, sont cultivés en sol stérile ou en association avec une bactérie du sol, *Rhizobium*. La teneur en azote dans les graines obtenues après récolte est mesurée et donne les résultats suivants (source : Amarger et Duthion, Agronomie, INRAE, 1983, 3).

	1979	1981
Sans <i>Rhizobium</i>	5,57	5,48
Avec <i>Rhizobium</i>	7,01*	6,88*

Figure 1 - Teneur en azote des grains après récolte en % de matière sèche

Différence significative au seuil \* :  $P < 0,01$  sinon significatif pour  $P < 0,05$

#### Étude 2



Figure 2 - Plants de pois chiche non inoculés (pas d'azote fourni) (A) et inoculés avec des bactéries *Rhizobium* (B) ; système racinaire montrant des nodosités sur les racines de pois chiche (C).

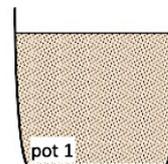
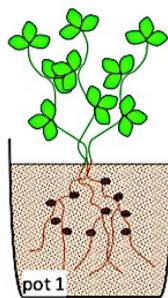
Tiré de Laranjo, *Microbiological Research* vol. 169, 2014

**Analyser les résultats pour en tirer le bénéfice tiré par la plante lorsqu'elle croît en présence de bactéries *Rhizobium*.**

#### Étude 3

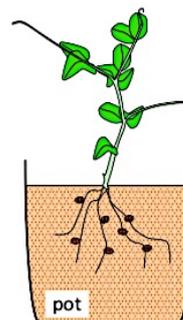
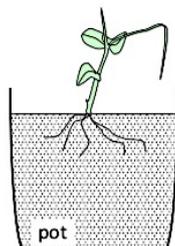
EXPERIENCE  
(D'après Ac Dijon):

plante "légumineuse" (pois, féverole,...) cultivée dans une terre ordinaire pendant 1 saison



La terre ayant servi à la culture de la plante légumineuse est conservée

pois cultivé sur sol synthétique sans azote



pois cultivé sur sol synthétique auquel on a ajouté de la terre du pot 1 ou avait été cultivée la plante légumineuse

**Qu'apporte cette expérience ?**

## 2) Rhizobium : une bactérie à deux formes

### a) Les *Rhizobium* dans le sol

*Rhizobium* constitue une famille de bactéries Gram- du sol, en concentrations d'environ 1 million d'individus par gramme de sol. Chimioorganotrophes aérobies, ces bactéries n'hydrolysent ni cellulose ni amidon.

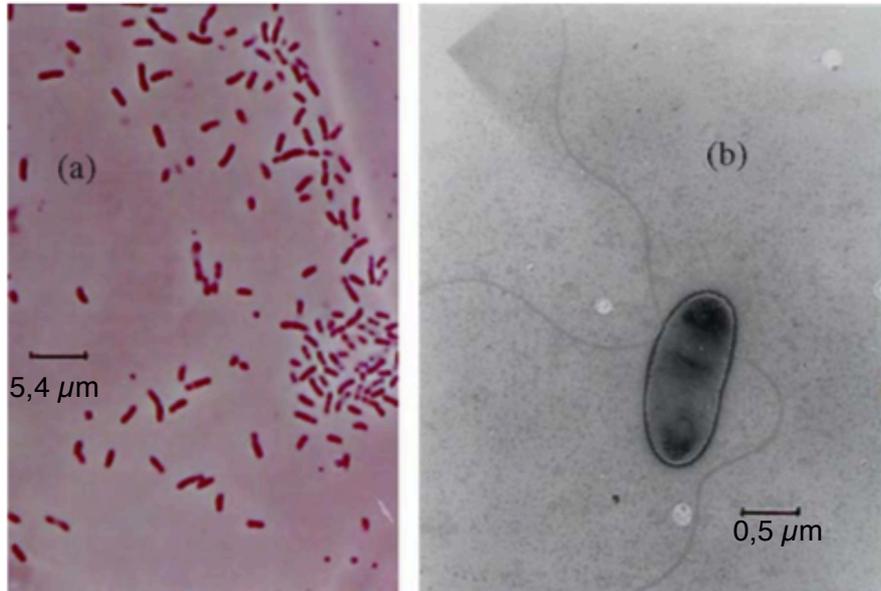


Figure 4 - (a) (b) : *Azorhizobium doebereineriae* (image tirée de Souza Moreira, « Nitrogen Fixation », 2002)

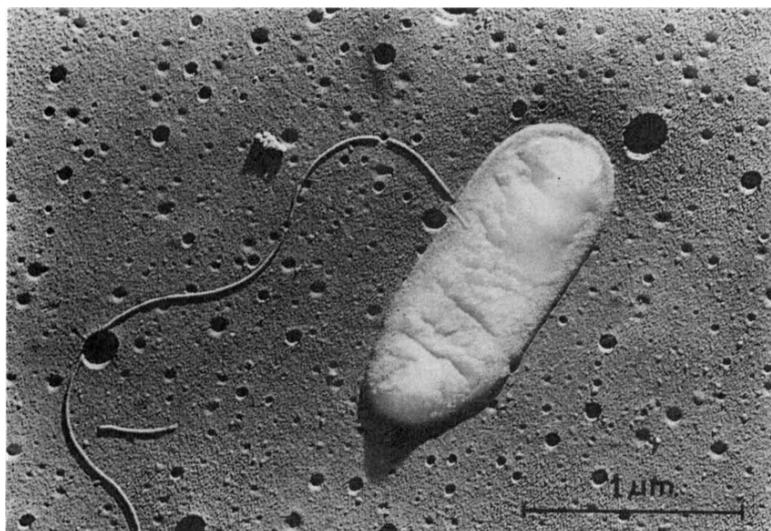


Figure 4 - (c) *Azorhizobium caulinodans* (image de Dreyfus et al, *International Journal of Systematic Bacteriology*, 1988)

**Identifier les 3 types de microscopies.**

**Estimer les dimensions de la bactérie et indiquer sa forme.**

**Que nous apprend l'image (c) ?**

### b) Les *Rhizobium* retrouvés dans les cellules racinaires

Lorsqu'on réalise une coupe transversale dans les nodosités, les cellules parenchymateuses présentent des formes intracellulaires de bactérie *Rhizobium*. On les nomme alors « bactéroïdes » (étymologie : « qui ressemble à des bactéries »).

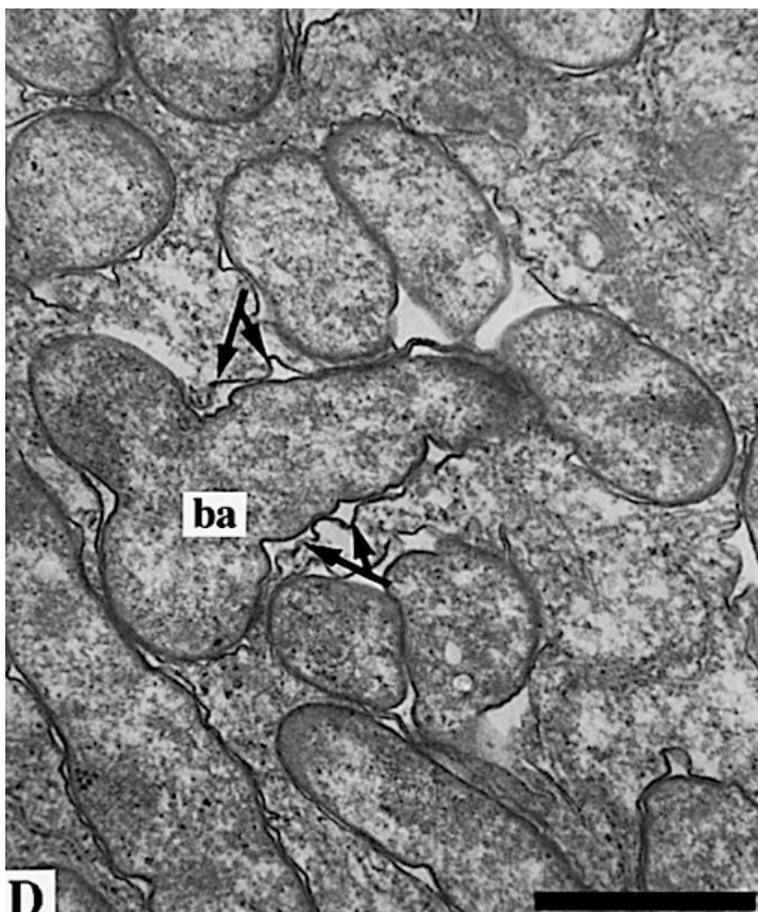
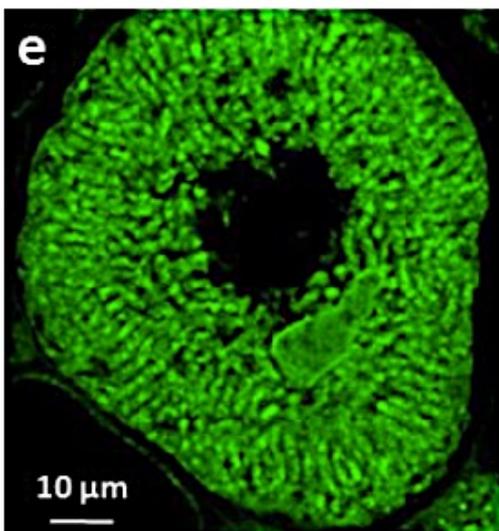
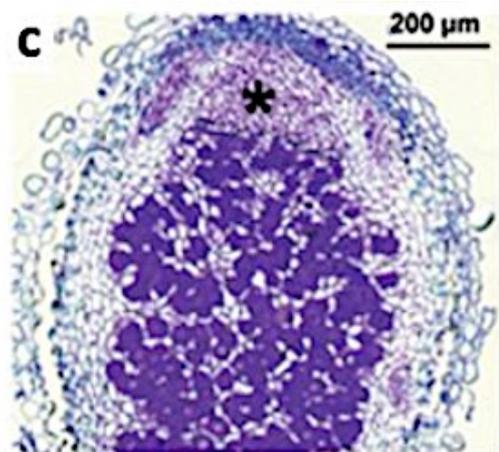
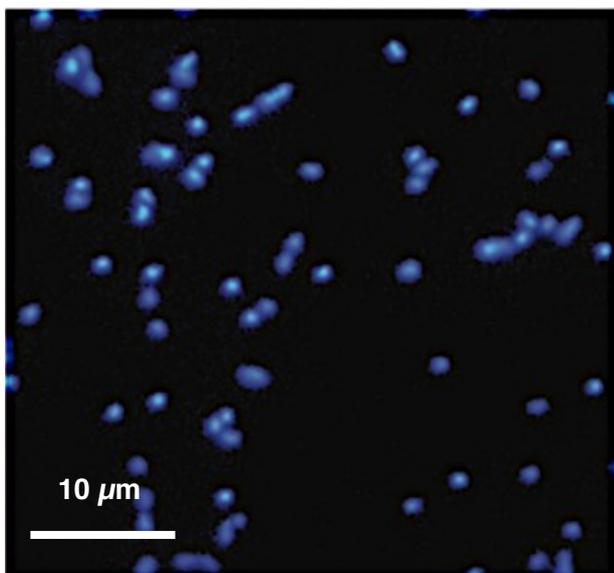
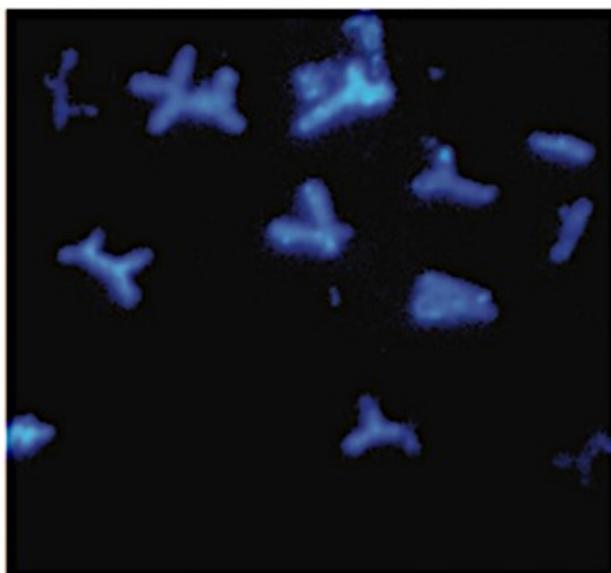


Figure 5 - (c) coupe dans une nodosité de Luzerne : la coloration au bleu de toluidine met en évidence les bactéries intracellulaires ; (e) cellule de parenchyme de nodosité de Luzerne avec coloration par fluorescence des bactéries (tiré de la thèse de J. Moreau, université Paris Saclay, 2019) ; (D) bactérie (ba) *Rhizobium leguminosarum* dans une cellule de nodosité de Pois (tiré de Tsyganov et al, Molecular and General Genetics, 1998). La barre d'échelle vaut 1  $\mu\text{m}$ . Les flèches pointent une membrane cellulaire.



Bactéries du sol



Bactéries extraites de cellules végétales

Figure 6 - Observation des bactéries *Rhizobium leguminosarum* par fluorescence au DAPI. Les deux images sont à la même échelle.

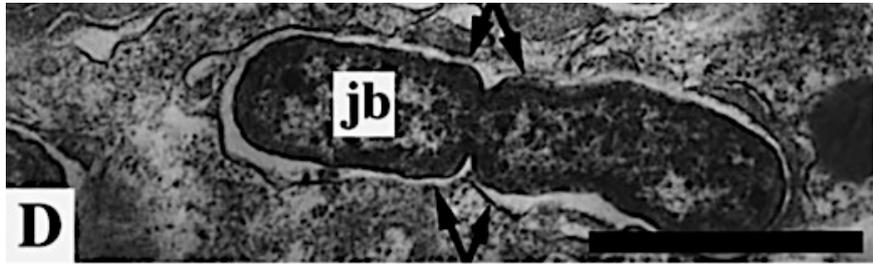


Figure 7 - bactéries juvéniles (jb) de *Rhizobium leguminosarum* dans une cellule de nodosité de Pois (tiré de Tsyganov et al, Molecular and General Genetics, 1998). La barre d'échelle vaut 1  $\mu\text{m}$ .

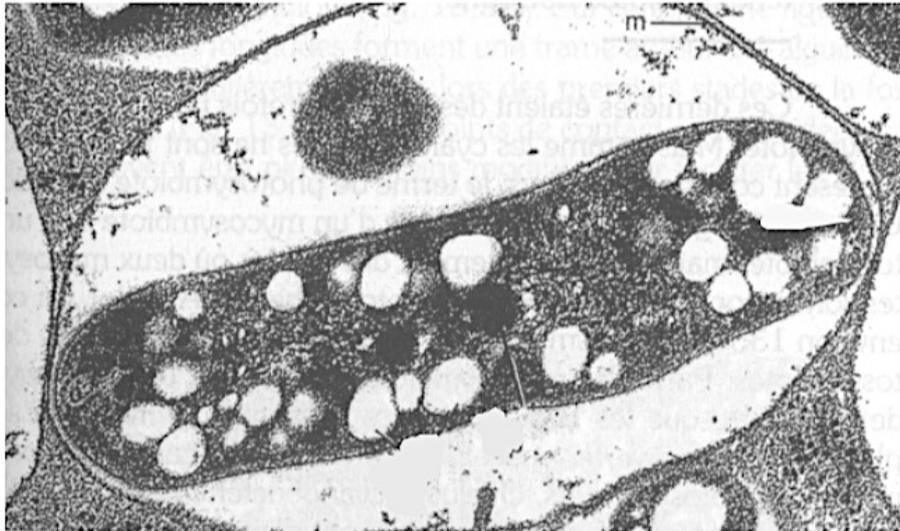
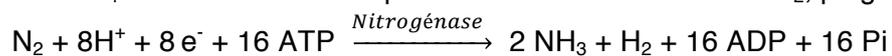


Figure 8 – Détail d'une bactéroïde (sujet Agro-Véto 2004). La largeur de l'image représente 3  $\mu\text{m}$ .

***Décrire les différences de la bactérie *Rhizobium* retrouvée dans les cellules végétales. Pour discuter des dimensions, le document 6 est le plus rigoureux.***

### **c) Des différences de métabolisme**

Dans le parenchyme racinaire, les *Rhizobium* produisent une enzyme, la nitrogénase, qui convertit le  $\text{N}_2$  atmosphérique en  $\text{NH}_4^+$ . Cette réaction est plus efficace en l'absence de  $\text{O}_2$ , piégé par la LegHb végétale.



***Identifier le type de réaction chimique***

***Citer les arguments en faveur de l'hypothèse de symbiose.***

### 3) La mise en place de l'association

Extrait du sujet de concours Agro 2004

(documents issus de diverses publications : J.M Gobat et al. dans « le sol vivant » 1998 Presses polytechniques et universitaires romandes ; Loureiro et al. dans *New Phytologist* n° 128, 1994) .

#### Document 1 – Micrographies photoniques de poils absorbants de racines.



10µm

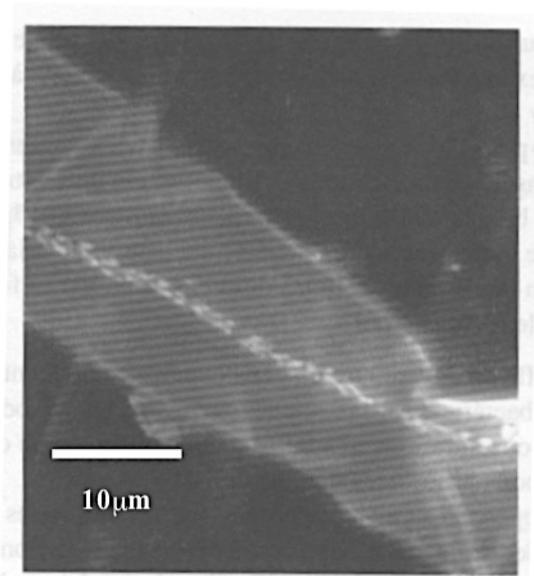
**1a** : poil absorbant en formation d'une racine cultivée en absence de *Rhizobium*



10µm

**1b** : poil absorbant d'une racine cultivée en présence de *Rhizobium*.  
La flèche désigne un canal intracellulaire en formation dans le poil.

**Document 1c** : Micrographie d'un poil absorbant de trèfle (*Trifolium sp*) cultivé en présence de *Rhizobium* ; l'observation est réalisée au microscope à fluorescence.



10µm

Le marqueur fluorescent utilisé se fixe préférentiellement aux parois bactériennes.

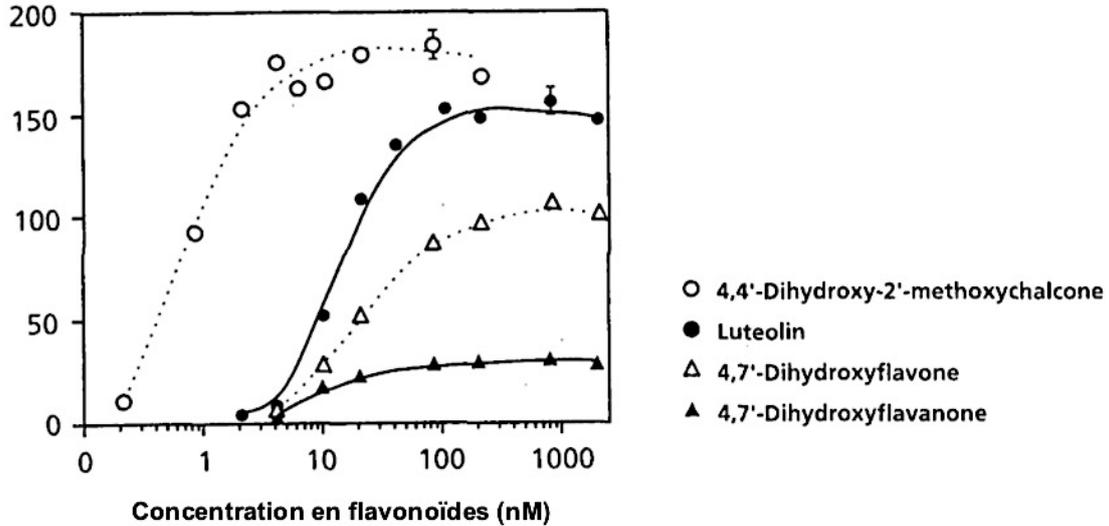
**Analyser les 3 images afin de formuler des hypothèses sur le début de formation d'une nodosité.**

**Document 2** - L'effet de la présence de *Rhizobium* sur la morphologie des poils absorbants (document 1b), peut aussi être obtenu en cultivant les racines en présence d'une des substances rejetées par les bactéries *Rhizobium* du sol. Cette substance est appelée « facteur Nod ». La synthèse de tels facteurs par les bactéries met en jeu plusieurs enzymes dont les gènes sont appelés « gènes *nod* ».

On a transformé génétiquement des bactéries *Escherichia coli* en groupant les systèmes de contrôle des gènes *nod* à ceux de la  $\beta$ -galactosidase, une enzyme facile à détecter.

L'activité de cette enzyme a été testée en présence de plusieurs substances qui sont rejetées par les racines dans le sol. Ces substances sont qualifiées d'exsudats. Celles qui sont testées font toutes partie d'un type de composants organiques appelés **flavonoïdes**.

Activité de la  $\beta$ -galactosidase en unités arbitraires



**Document 2** : effet de la présence de flavonoïdes à différentes concentrations sur l'activité  $\beta$ -galactosidase d'une culture de bactéries *E. coli* transformées. Les différents flavonoïdes testés sont issus d'exsudats de racine de Luzerne.

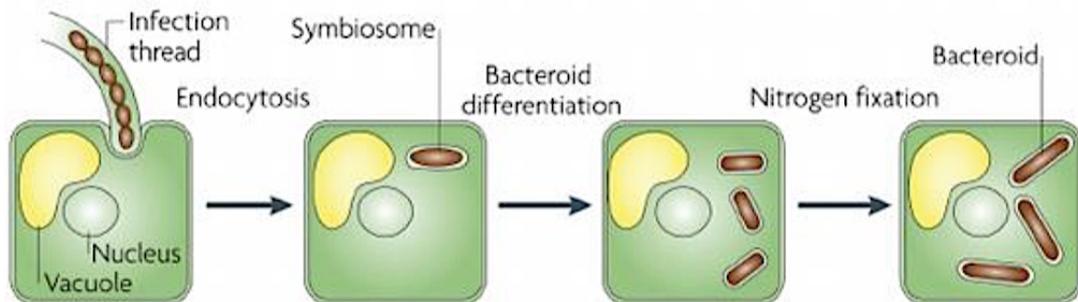
**Analyser ces résultats et proposer un modèle de communication chimique entre *Rhizobium* et plante hôte. Proposer un schéma bilan.**

### CONCLUSION

Dans les cellules du parenchyme, les bactéries *Rhizobium* présentent :

- une membrane supplémentaire issue de l'endocytose ;
- un volume multiplié par 40 ;
- un changement de forme : de bacille, elle devient en Y, en T...
- apparition de membranes internes (issues de l'expansion de la membrane plasmique).

Les cellules hôtes se multiplient, grandissent et produisent de la Leghémoglobine, qui piège le dioxygène.



tiré de la thèse de Louis Dumont de Chassart

Notion de spécificité d'association : le spectre est plus ou moins large selon la bactérie.

*Azorhizobium* ne s'associe qu'avec *Sesbania*

*Ensifer* s'associe à 120 espèces différentes

*Sinorhizobium meliloti* ne s'associe qu'aux espèces des genres *Medicago*, *Melilotus* et *Trigonella*.