

# Etude cytophysiologique des mycorhizes à vesicules et arbuscules. Approche ultrastructurale et fonctionnelle.

Christine Jeanmaire

### ► To cite this version:

Christine Jeanmaire. Etude cytophysiologique des mycorhizes à vesicules et arbuscules. Approche ultrastructurale et fonctionnelle.. Biologie végétale. Université Henri Poincaré - Nancy 1, 1991. Français. NNT: 1991NAN10070. tel-01748593

# HAL Id: tel-01748593 https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01748593

Submitted on 29 Mar 2018

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers. L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



### AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

# LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4 Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10 <u>http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg\_droi.php</u> <u>http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm</u>



# THESE

présentée pour l'obtention du titre de DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE NANCY I Spécialité : Biologie Végétale et Forestière

Par

**Christine JEANMAIRE** 

### ETUDE CYTOPHYSIOLOGIQUE DES MYCORHIZES A VESICULES ET ARBUSCULES. APPROCHE ULTRASTRUCTURALE ET FONCTIONNELLE.

Soutenue publiquement le 15 Février 1991 devant la commission d'examen :

MM. DEXHEIMER, Président BOTTON, Rapporteur GARBAYE, Rapporteur BONNET-MASIMBERT, Examinateur

#### AVANT PROPOS

Ce travail a été effectué au laboratoire de Biologie des Ligneux de l'Université de Nancy I. Je tiens à remercier toutes les personnes qui, d'une manière ou d'une autre, m'ont permis de mener à bien ce travail et en particulier:

Monsieur J. DEXHEIMER, professeur à l'Université de Nancy I, qui m'a accueillie dans son laboratoire. Il m'a initiée à la recherche et m'a fait bénéficier de ses connaissances en me faisant découvrir le domaine des mycorhizes. Je le remercie de présider ce jury.

Messieurs B. BOTTON, professeur à l'Université de Nancy I, et J. GARBAYE, Directeur de Recherches au Laboratoire de Microbiologie Forestière du Centre INRA de Nancy, qui ont accepté de juger ce travail.

Monsieur M. BONNET-MASIMBERT, directeur de Recherches à la Station d'Amélioration de l'INRA d'Orléans, qui malgré ses multiples occupations a accepté de participer à ce jury de thèse. Ses encouragements m'ont été précieux.

Mes remerciements vont également à tous mes collègues et amis qui m'ont encouragée et soutenue. Merci pour leur aide et leur amitié.

Enfin, j'exprime ma reconnaissance à mes parents et ma famille pour leur soutien affectueux, leur patience et leur indulgence. Ce mémoire leur est dédié.

#### SOMMAIRE

INTRODUCTION	1
MATERIEL ET METHODES	4
1. MATERIEL	5
1.1. LES PLANTES-HOTES	5
1.2. LE MATERIEL FONGIQUE	5
2. METHODES	6
2.1. TECHNIQUES DE CULTURE	6
2.1.1. Le substrat	6
2.1.2. La mycorhization	6
2.2. PRELEVEMENT DES MYCORHIZES	7
2.3. MICROSCOPIE PHOTONIQUE	7
2.3.1. Coloration par le bleu Trypan	7
2.3.2. Les coupes semi-minces, coloration par le bleu de toluidine	8
2.4. MICROSCOPIE ELECTRONIQUE	8
2.4.1. Etude cytologique	8
2.4.1.1. La fixation	8
2.4.1.2. La déshydratation	9
2.4.1.3. L'imprégnation et l'inclusion	9
2.4.1.4. Les coupes fines	10
2.4.2. Etudes cytochimiques	10
2.4.2.1. Mise en évidence des protéines	10
(JWIF! 1300/	10

2.4.2.2.	Mise en évidence des polysaccharides, Test PATAg	11
2.4.2.3.	Coloration par l'acide phosphotungstique (APT)	11
2.4.3. Tech par	nnique de marquage de la chitine le complexe WGA-or colloidal	11
2.4.4. Etuc	des cytoenzymologiques	13
2.4.4.1.	Mise en évidence des phosphatases neutres	13
2.4.4.2.	Mise en évidence des phosphatases alcalines	15
2.4.4.3.	Mise en évidence de la glucose-6-phosphatase	15

•

CHAPITRE I: ETUDE ULTRASTRUCTURALE DES MYCORHIZES A VESICULES ET ARBUSCULES OBTENUES EN CONDITIONS CONTROLEES CHEZ DEUX ESPECES DE ROSACEES LIGNEUSES	. 20
1. INTRODUCTION	. 21
2. ETUDE MORPHOLOGIQUE EN MICROSCOPIE PHOTONIQUE	. 21
3. ETUDES CYTOLOGIQUES EN MICROSCOPIE ELECTRONIQUE,	. 22
3.1. LES HYPHES INTERCELLULAIRES	. 22
3.2. LES STRUCTURES ARBUSCULAIRES, ETABLISSEMENT ET DEGENERESCENCE	. 26
3.3. LES MODIFICATIONS CYTOPLASMIQUES DANS LES CELLULES INFECTEES	. 32
3.3.1. Les mitochondries	. 32

3.3.2. Les plastes	32
3.3.3. L'appareil de Golgi	33
3.3.4. Le réticulum endoplasmique	33
3.3.5. L'appareil vacuolaire	34
3.3.6. Le noyau	34
3.4. LES PELOTONS	34
4. DISCUSSION ET CONCLUSION	35
PLANCHES PHOTOGRAPHIQUES	48

1.	INTRODUCTION	60
2.	CONDITIONS DE RECOLTE	61
	2.1. DESCRIPTION DES STATIONS	61
	2.2. DESCRIPTION DES PRELEVEMENTS	61
	2.3. DESCRIPTION DES OBJETS RETENUS	61
3.	RESULTATS	62
	3.1. ETUDE EN MICROSCOPIE PHOTONIQUE	62
	3.2. ETUDE EN MICROSCOPIE ELECTRONIQUE	63
	3.3.1. Les mucerbizes prélouées sur	
	la station de Sexey-aux Forges	63
	3.2.1.1. Les hyphes intercellulaires	63
	3.2.1.2. Les structures intracellulaires	64
	3.2.2. Les mycorhizes prélevées sur la station de Brabois	66
	3.2.2.1. Les hyphes intercellulaires	66

		3.2.2.2.	Les str	uctures	intracellu	laires .	66
	3	.2.3. Sui en	vi de la fonction	. mycorhi des sai	ization isons	•••••	68
4.	DISC	USSION ET	conclus	ION		••••	70
	4.1.	LES MYCO	RHIZES N	ATURELLE	S DU MERIS	IER	70
	4.2.	COMPARAI EN CONDI PRELEVEE	SON ENTR TIONS CO S EN CON	E LES MY NTROLEES DITIONS	CORHIZES O ET LES MY NATURELLES	BTENUES CORHIZES	74
	4.3.	ETUDE DE SUR UNE	L'EVOLU ANNEE DE	TION DE VEGETAT	LA MYCORHI	ZE • • • • • • • • • • •	75
							•
PL/	ANCHES	5 PHOTOGE	APHIQUES				78

. ....

SECONDE	PARTIE :	ETUDE	FONCT	IONNELLE	DES	NYCORH IZES	
A VESICI	JLES ET	<b>ARBUSCI</b>	JLES				
ETUDES I	ENZYHOLO	GIQUES					 104

CHAP I	TRE	I: L	OCA							S NI	DPas	iqu	les		105
		L	ruto			COM	11 20	JU	<b>MLL</b>	.10M	CEF	п.	• • •		100
1.	INTRO	ODUC	TIO	Ν			• • •	• • •		•••					107
2.	RESUI	LTAT	s.		• • •		• • •		• • • •	• • •	• • • •	• • •	• • •		107
з.	DISCI	USSI	ON I	ет с	ONCI	LUSI	ON	• • •					• • •	•••	109
	3.1.	La	nati	ure	des	enz	yme	s m:	ises	en	jeu	••	•••		109
	3.2.	La des	sign ac	nifi tivi	cat: .tés	iuon pho	n de Sph	la ata:	loc siqu	alis es 1	sati neut	on res			110
	3.3.	Rôl pho	e po spha	ossi atas	ble ique	de es n	ces eut	ac: res	tivi dan	tés s la	a sy	mbi	ose		111
PLA	NCHES	5 PH	ото	GRAP	HIQ	JES				• • • •					113

# 

CONCLUSION G	ENERALE	•	•	• •	•	•	• •	•	 •	•	• •	•	•	•••	•	•	•	••	•	•	•	 •	•	٠	•	• •	134	ł
BIBLIOGRAPHI	Ε								 	•										•		 •	•		•		141	Ĺ

.

#### LEGENDE DES PLANCHES

am	amyloplaste
Ar	arbuscule
са	couche d'apposition
Cc	cellule corticale
CcT	cellule corticale à tanins
Н	cellule-hôte
CNM	cellule sans endophyte
сі	ciment
cmv	corps multivésiculaire
сс	cylindre central
Су	cytoplasme
D	dictyosome
Ε	endophyte
En	endoderme
f	fibrilles
fp	formations plasmalemmiques
gp	granule de polyphosphate
ha	hyphe arbusculaire
hic	hyphe intercellulaire
hp	hyphe d'un peloton
	interface
m	matrice .
mé	méat

•

mi mitochondrie

- Ny noyau
- **p** plasmalemme
- PE paroi de l'endophyte
- PH paroi de la cellule-hôte
- **PEL** peloton
- Pl plaste
- pr polyribosome
- **RE** réticulum endoplasmique

- r ribosome
- $\boldsymbol{\mathsf{SR}}$  surface racinaire
- t tubule
- Va vacuole
- Vé vésicule

Sauf indication contraire le trait noir porté sur chaque figure représente 1 µm.

# **INTRODUCTION**

Le nom "Mykorhiza" apparaît dans la littérature avec les écrits de FRANK (1885) qui publie en allemand sur "la symbiose racinaire permettant la nutrition de certains arbres par leurs champignons associés".

Ce terme a été repris dans toutes les langues (mycorhize, mycorrhiza, micorrize...), il désigne une association symbiotique entre les racines d'une plante-hôte et un champignon.

Il existe plusieurs types de mycorhizes classées à partir de leur organisation morphologique: les ectomycorhizes, les endomycorhizes et les ectendomycorhizes.

Les ectomycorhizes, formées essentiellement par des Basidiomycètes et des Ascomycètes, sont caractérisées par la formation d'un manchon mycélien autour de la racine, <u>le manteau</u>, et par un réseau d'hyphes entre les cellules corticales, <u>le réseau</u> <u>de Hartig</u>.

Dans les endomycorhizes, le champignon, après avoir perforé la paroi, pénètre dans les cellules corticales et établit une structure intracellulaire. Cette structure peut présenter des morphologies différentes. On distingue les <u>mycorhizes à pelotons</u> (mycorhizes des orchidées, mycorhizes éricoïdes, mycorhizes de certaines cistacées) et les <u>mycorhizes à vésicules et arbuscules</u> (ou mycorhizes V.A. ou VAM).

Les ectendomycorhizes présentent à la fois des structures d'ectomycorhizes (<u>manteau</u> et <u>réseau de Hartig</u>) et des structures intracellulaires (<u>peloton</u> ou "<u>sucoir</u>" pour les mycorhizes monotropoïdes).

La plus commune de ces associations mycorhiziennes est l'association de type vésiculo-arbusculaire. Elle présente une large aire de répartition géographique. Elle se rencontre sous des climats très différents depuis les zones arctiques jusqu'aux zones tropicales (POWELL et BAGYARAJ 1984) et sur des plantes-hôtes très variées aussi bien herbacées que ligneuses.

Les endomycorhizes ne sont pas visibles à l'oeil nu, le champignon ne provoquant pas de modifications importantes de la structure externe de la racine. Le champignon extraracinaire est représenté par quelques hyphes qui se ramifient dans le sol. La partie intraracinaire du champignon est la plus importante, elle est composée de quatre types de structures: les hyphes intercellulaires, les pelotons, les vésicules et les arbuscules. Ce sont les deux dernières formations qui ont donné leur nom à ce type de mycorhize.

Bien que très répandues, les mycorhizes à vésicules et. essentiellement étudiées sur des arbuscules sont espèces herbacées; seules quelques études ponctuelles ont été réalisées sur des essences ligneuses (Liquidambar: KINDEN et BROWN 1975 STRULLU 1978; Citrus: NAGY et NORDBY a,b,c, 1976; Taxus baccata: 1980; Acer pseudoplatanus: MARX 1981; Eucalyptus camaldulensis: BOUDARGA et DEXHEIMER 1988, BOUDARGA 1989; Acer saccharum: YAWNEY et SCHULTZ 1990). Ces études portent essentiellement sur de jeunes plants sans suivi du système racinaire mycorhizé.

C'est pourquoi nous avons choisi d'étudier, dans une première partie de ce travail, les associations endomycorhiziennes d'essences ligneuses. Les trois espèces examinées, pommier, merisier et catalpa n'ont jamais été décrites. Il s'agit donc d'un travail tout à fait original.

Pour le meriser, un suivi des mycorhizes récoltées dans la nature, a également été réalisé sur une année de végétation.

Les mycorhizes résultant de la confrontation étroite de deux organismes constituent des systèmes biologiques complexes.

Si des études physiologiques sont nécessaires pour comprendre leur fonctionnement global, des études au niveau cellulaire sont indispensables pour élucider la structure fine de leur organisation, et les modalités des interactions entre les partenaires.

C'est cette approche ultrastructurale, que nous avons privilégié dans notre travail, à la fois pour étudier l'organisation des mycorhizes V.A. d'essences ligneuses, et pour essayer de dégager un schéma fonctionnel des mycorhizes à vésicules et arbuscules, en localisant au niveau cellulaire des activités enzymatiques.

Cette dernière partie de notre travail a été réalisée sur l'oignon dont l'ultrastructure est bien connue (DEXHEIMER *et al.* 1979) et sur lequel des localisations d'activités enzymatiques ont déjà été effectuées (phosphatases acides: GIANINAZZI *et al.* 1979; phosphatases alcalines: GIANINAZZI-PEARSON et GIANINAZZI 1976, 1978, GIANINAZZI *et al.* 1979, MARX 1981; ATPases: MARX 1981, MARX *et al.* 1982). Il nous a donc semblé être le matériel le mieux adapté, en continuité avec les travaux déjà réalisés, à la mise en évidence d'autre activités enzymatiques susceptibles d'intervenir dans les processus d'échanges entre les deux partenaires.

Ces études ultrastruturales et enzymologiques, en microscopie électronique, vont nous permettre de proposer, en conclusion de ce travail, un schéma fonctionnel des mycorhizes à vésicules et arbuscules.

# **MATERIEL ET METHODES**

#### I. MATERIEL.

#### 1,1. LES PLANTES-HOTES.

Notre travail a été effectué d'une part sur plusieurs espèces ligneuses (merisier, pommier et catalpa) et d'autre part sur une espèce herbacée, l'oignon.

Pour <u>les merisiers (Prunus avium L.)</u>, il s'agit soit de plantes issues de vitroplants (clone 106 - INRA Orléans) âgées de trois mois et cultivées en pot sur un mélange désinfecté de tourbe-terre-gravier qui nous ont été fournies par le laboratoire de Physiopathologie végétale du centre d'Epoisses, soit de rejets récoltés dans la nature sur deux sites de prélévements.

Les <u>pommiers (*Pirus malus* L.)</u> sont issus de semis. Ils sont cultivés en pot sur un mélange tourbe-vermiculite.

Les catalpas (Catalpa bignonioïdes Walt.) sont également issus de semis, ils sont cultivés en pot sur un mélange désinfecté tourbe-terre-gravier. Ils nous ont été fournis par le laboratoire de Physiopathologie végétale du centre d'Epoisses.

Les travaux déjà effectués sur <u>l'oignon (Allium cepa)</u>, nous ont orienté vers cette espèce pour réaliser la mise en évidence de nouvelles enzymes susceptibles d'intervenir dans les échanges entre les deux partenaires.

Les oignons sont cultivés, en serre, sur de la terre de jardin désinfectée.

De manière à disposer d'un matériel de référence, nous avons également travaillé sur <u>des racines d'*Allium cepa* sans mycorhizes</u>, au niveau des zones habituellement infectées et au niveau des zones méristématiques.

#### 1.2. LE MATERIEL FONGIQUE.

Pour nos travaux nous avons bénéficié de <u>trois souches de</u> <u>Glomus de provenance différentes</u>, qui nous ont été fournies par le laboratoire de Physiopathologie végétale du centre d'Epoisses (INRA Dijon):

- Glomus intraradices (souche LPA 8, INRA Dijon)

- Glomus mosseae (en provenance de ROTHAMSTED experimental station, GBR)

Glomus fasciculatum (provenance grèce)

Nous nous sommes également intéressée à <u>l'endophyte naturel</u> <u>du merisier</u> que nous avons récolté dans la nature. Cependant il ne nous a pas été possible d'isoler et de déterminer le (ou les) partenaire(s) fongique(s).

Enfin, nous avons réalisé des cultures de <u>Mucor</u> en boîtes de Petri sur un milieu d'entretien semi-liquide. Ce champignon Phycomycète est proche des Endogonacées. Il présente l'avantage de se cultiver en culture pure. Ce matériel nous a permis de réaliser des études enzymatiques sur du champignon isolé.

#### II. METHODES.

#### 2.1. TECHNIQUES DE CULTURES.

#### 2.1.1. Le substrat.

Il est soit composé de terre de jardin désinfectée, ou d'un mélange tourbe-vermiculite (1-1), ou encore d'un mélange tourbe-terre-gravier (1-1-1).

Les substrats de culture sont désinfectés, avant leur emploi au laboratoire, par trois passages de 15 mn chacun à l'autoclave à 120°c. Le substrat est laissé 24 heures au repos entre chaque passage.

#### 2.1.2. La mycorhization.

Les Endogonacées sont des champignons qui ne se maintiennent pas en culture pure (seulement quelques jours de survie) et qui nécessitent la présence d'une plante-hôte.

La conservation de nos souches endomycorhizogènes est réalisée au laboratoire sur des racines d'*Allium cepa*. Nous avons choisi cette plante hote pour des raisons pratiques: obtention rapide de racines, matériel peu exigeant vis-à-vis des conditions de culture et facile à mycorhizer.

Pour inoculer de nouvelles plantes, des fragments de racines d'oignons contenant l'endophyte sont mélangés au substrat des pots à infecter. Les mycorhizes ainsi formées sont prélevées au bout de 8 à 12 semaines.

#### 2.2. PRELEVEMENT DES MYCORHIZES.

Les plantes utilisées pour les études cytologiques sont dépotées au laboratoire. Leur système racinaire est lavé à l'eau courante afin de le débarrasser du substrat (sable, terre...). Les racines sont prélevées sous une loupe binoculaire.

Différents critères permettent de reconnaître les parties infectées:

- aspect jaunâtre des racines

- présence de zones opaques

- rareté des poils absorbants et présence de filaments mycéliens au contact des racines observées (dans ces zones, des agrégats de terre adhérent aux racines).

Il est nécessaire, pour permettre une bonne pénétration des produits de fixation, d'incubation et d'inclusion, que les dimensions des échantillons prélevés ne soient pas trop importantes. Les racines infectées sont donc débitées en fins fragments de quelques mm de long, dans le mélange fixateur, pour éviter l'altération des structures cellulaires.

#### 2.3. MICROSCOPIE PHOTONIQUE.

#### 2.3.1. Coloration par le bleu Trypan (PHILIPPS et HAYMAN 1970).

Cette technique permet de vérifier rapidement la présence de mycorhizes V.A. sur le système racinaire d'une plante-hôte.

Le système racinaire est prélevé puis lavé à l'eau du robinet afin de le dégager des particules terreuses.

Les racines à traiter sont coupées en morceaux de quelques centimètres de long et mises dans une solution de potasse à 10 % pendant trois heures à l'étuve à 90 °C.

Elles sont ensuite lavées plusieurs fois à l'eau du robinet (le dernier lavage peut être réalisé avec de l'eau très légèrement acidifiée par HCl), puis colorées par une solution de bleu Trypan à 0,1 % dans du lactophénol pendant un quart d'heure à 90 °C.

Les racines colorées sont rincées par une solution eau-lactophénol à 25 %, puis montées entre lame et lamelle, dans une goutte d'eau, pour l'observation au microscope photonique.

Le matériel ainsi traité peut être conservé quelque temps dans l'eau en attendant l'observation.

L'endophyte apparaît coloré en bleu sur fond clair des cellules racinaires. Il est facilement observable et cette technique permet de distinguer les arbuscules, les pelotons, les vésicules et les hyphes intercellulaires.

#### 2.3.2. Les coupes semi-minces. Coloration par le bleu de toluidine.

Les coupes semi-minces permettent de localiser les zones intéressantes d'un objet et de contrôler s'il renferme ou non l'endophyte.

Elles sont réalisées sur le matériel fixé et inclus pour l'étude au microscope électronique.

Ce sont des coupes d'épaisseur supérieure à 100 nm réalisées avec un couteau de diamant sur un ultramicrotome Porter Blum.

Les coupes minces sont recueillies sur une lame de verre et collées à celle-ci par la chaleur.

Elles sont colorées par le bleu de toluidine à pH alcalin (bleu de toluidine à 0,1 % et  $Na_2CO_2$  à 3%) en le chauffant pendant une dizaine de secondes. Les coupes sont lavées à l'eau courante pour l'observation.

#### 2.4. MICROSCOPIE ELECTRONIQUE.

2,4.1, Etude cytologique.

2.4.1.1. La fixation.

Les fixateurs utilisés sont le glutaraldéhyde et le tétroxyde d'osmium. La fixation est réalisée à basse température  $(0^{\circ}-4^{\circ}C)$ .

<u>Pour des études morphologiques ou cytochimiques</u>, la technique est la suivante:

-Les racines renfermant l'endophyte sont débitées en fragments de quelques millimètres de long. Les objets sont mis dans un tube contenant du glutaraldéhyde à 2,5% dans du tampon phosphate M/10 pH 7,2. On laisse 7 à 8 heures en contact.

-Les objets sont rincés, toute une nuit, dans le même tampon dilué de moitié par de l'eau distillée.

-Ils sont ensuite post-fixés pendant une heure par le tétroxyde d'osmium à 2% dans du tampon phosphate pH 7,2.

<u>Pour des études cytoenzymologiques</u>, la technique diffère un peu:

-Il faut éviter l'inactivation des enzymes par une fixation trop longue ou des concentrations trop élevées en glutaraldéhyde. -Le tampon phosphate est remplacé par du tampon cacodylate au même pH pour ne pas introduire du phosphate inorganique.

-Pour chaque activité enzymatique nous préciserons la méthode de fixation employée.

#### 2.4.1.2. La deshydratation.

Aprés la post-fixation osmique, les objets sont rincés soigneusement par l'eau distillée, puis déshydratés par des bains d'acétone de concentration croissante.

acétone à 10 % pendant 1/4 d'heure
acétone à 20 % pendant 1/4 d'heure
acétone à 40 % pendant 1/4 d'heure
acétone à 60 % pendant 1/4 d'heure ou une nuit
acétone à 80 % pendant 1/4 d'heure ou une nuit
(au moins une nuit pour l'un des deux bains précédents.)
acétone à 95 % pendant deux fois 20 mn
acétone à 100 % pendant trois fois 20 mn.

#### 2.4.1.3. L'imprégnation et l'inclusion.

Les objets sont progressivement imprégnés pendant environ une semaine suivant ce processus:

- 2/3 d'acétone et 1/3 de résine pure
- 1/3 d'acétone et 2/3 de résine pure
- résine pure.

Les échantillons sont placés dans des moules remplis de résine pure et mis à polymériser à 70 °C à l'étuve pendant 24 à 48 heures.

#### Composition de la résine Epon:

Epikote 812 (Epon)	9,1 ml
DDSA (anhydride dodécénylsuccinique)	6,2 ml
MNA (anhydride méthylnadique)	4,7 ml
DMP 30 (2-4-6 trisdiméthylaminométhylphénol)	0,35 ml

#### 2.4.1.4. Les coupes fines.

Les coupes fines (60 à 100 nm) sont réalisées à l'aide d'un couteau de diamant sur un ultramicrotome Porter blum.

Pour des études morphologiques, elles sont recueillies sur des grilles en cuivre puis contrastées pendant 15 à 20 mn par l'acétate d'uranyle selon VALENTINES (1961), puis durant 15 mn par le citrate de plomb selon REYNOLDS (1963). Dans le cas des études enzymatiques, seul l'acétate d'uranyle est utilisé comme contrastant.

Après un soigneux rinçage, les grilles peuvent être observées au microscope électronique.

Pour des études cytochimiques où les réactions font souvent appel à des substances susceptibles d'attaquer le cuivre, les coupes sont recueillies sur des grilles en or.

#### 2.4.2. Etudes cytochimiques.

#### 2.4.2.1. Mise en évidence des protéines (SWIFT, 1968).

La réaction utilisée met en évidence les protéines renfermant de la cystine.

Solution	A :	Méthanémine à 3 % Nitrate d'argent à 5 %	100 ml 5 ml
Solution	в:	Acide borique à 1,44 % Borax à 1,9 %	10 ml 100 ml
Le réacti	lf s	se prépare en mélangeant au moment de	l'emploi:

25 ml de la solution A 5 ml de la solution B 25 ml d'eau distillée.

Les coupes sont recueillies sur des grilles en or. Les grilles sont immergées dans la solution réactive mise dans de petits tubes fermés et placés à 45°C dans l'étuve à l'obscurité pendant deux heures.

Après plusieurs lavages soigneux par l'eau distillée, les grilles peuvent être observées au microscope électronique.

#### 2.4.2.2. Mise en évidence des polysaccharides (Test PATAg)

Le test PATAg mis au point par THIERRY (1967) est une réaction spécifique de mise en évidence des polysaccharides à liaison  $\alpha(1-4)$  et  $\beta(1-4)$ ,

Il se pratique sur coupes minces disposées sur des grilles en or.

Nous pratiquons d'abord une oxydation par l'acide periodique à 1 % dans l'eau distillée pendant 30 mn. L'acide periodique attaque les polysaccharides en liaison  $\alpha(1-4)$  et  $\beta(1-4)$  alors que les liaisons (1-3) ne sont pas touchées.

Les coupes sont ensuite soigneusement rinçées par l'eau distillée, puis mises à flotter sur une solution de thiocarbohydrazide à 0,2% dans l'acide acétique à 20 % pendant 5 heures à température ambiante.

Les grilles sont alors lavées dans des concentrations décroissantes d'acide acétique (20%, 15%, 10%, 5%) à raison de deux bains de cinq minutes pour chaque concentration. Elles sont ensuite rinçées avec soin par de l'eau distillée,

Elles sont ensuite rincées avec soin par de l'eau distillée, puis mises dans une solution de protéinate d'argent à 1% dans de l'eau bidistillée pendant 30 mn à l'obscurité et à la température du laboratoire.

Les grilles après un lavage à l'eau bidistillée peuvent être observées au microscope électronique.

# 2.4.2.3. Coloration par l'acide phosphotungstique (APT).

L'acide phosphotungstique est un colorant spécifique du plasmalemme (RAMBOURG 1967; ROLAND *et al.* 1972; VIAN *et ROLAND* 1972). Les coupes sont recueillies sur des grilles en or *et* colorées pendant 2 à 5 minutes par une solution d'acide phosphotungstique à 1 % dans de l'acide chromique à 10 %. Elles sont rincées à l'eau distillée et observées au microscope électronique.

#### 2.4.3. Technique de marquage de la chitine par le complexe WGA-or colloidaL.

Nous avons utilisé la lectine du blé (Wheat germ agglutinin) pour localiser les résidus N-acétyl-D-glucosamines qui entrent dans la composition de la chitine.

Préparation de la solution d'or colloïdal:

- Porter 100 ml d'une solution d'acide Tetrachloroaurique à 0,01 % à ébullition.

- Ajouter 4 ml de citrate de sodium (à 1%) en continuant de chauffer pendant 5 à 10 mn jusqu'à obtenir une couleur rouge bordeaux.

- Laisser refroidir la solution et ajuster le pH à 9,7 avec une solution de  $K_{\Xi}CO_{\Xi}$  (0,02M) si le pH est acide ou une solution d'HCl (0,02M) si le pH est alcalin.

Le pH est contrôlé dans un tube à hémolyse avec 1 ml de solution et 3 gouttes de PEG 20000 à 1 %.

#### <u>Préparation de la solution de lectine:</u> Dissoudre la WGA dans une solution d'HCl 2.5 mM (1 mg/ml).

#### <u>Préparation du complexe lectine-or colloïdal:</u>

- Il faut déterminer la concentration de WGA et d'or qui va donner un complexe stable.

Une gamme de dilution est réalisée. Dans une série de tubes contenant 0,1 ml de la solution de WGA de dilutions décroissantes (soit 0,1 mg; 0,05 mg; 0,025 mg; 0,0125 mg ... de lectine), sont ajoutés 0,5 ml de la solution d'or colloïdal et 0,1 ml de NaCl.

La stabilité du complexe est atteinte lorsque la solution ne vire plus au bleu quand on ajoute le NaCl dont on utilise le pouvoir électrolytique. Il est alors possible de calculer les quantités de WGA et d'or colloïdal à utiliser pour la réalisation du complexe.

- Ajouter au complexe quelques gouttes de PEG 20000 à 1 %.

- Le complexe WGA-or colloïdal est centrifugé à 15900 g pendant 50 mn. Le surnageant est éliminé. Le sédiment est dilué dans 5 ml de tampon trischloride II (composé de tampon trischloride 20 mM + PEG 0,04 % + Azide de sodium 0,02 %).

#### Marquage:

- Les coupes sont recueillies sur des grilles en or et mises à flotter pendant une heure dans des solutions de complexe WGA-or colloïdal diluées à différentes concentrations dans du tampon tris chloride 20 mM.

Nous avons obtenu un bon marquage de nos coupes avec une dilution de 1/6.

- Les grilles sont rincées deux fois 30 mn par le tampon trischloride puis par l'eau distillée.

#### Contraste:

Les coupes sont contratées pendant 5 mn par l'acétate d'uranyle et 5 mn par le citrate de plomb.

#### Témoins:

Les témoins sont réalisés en plongeant les grilles pendant 10 mn dans une solution composée d'un volume de complexe WGA-or colloïdal dilué et d'un volume de N-acétyl-D-glucosamine à 0,2 M.

#### 2.4.4. Etudes cytoenzymologiques.

La réaction de mise en évidence des activités enzymatiques se pratique *in toto* sur des objets très petits.

Toutes les manipulations sont faites dans des récipients très propres et à température de la glace fondante.

Le principe de mise en évidence des activités enzymatiques est le suivant.

Après préfixation par le glutaraldéhyde, les objets sont incubés dans un milieu contenant :

- le substrat

- un agent de capture (un sel soluble de plomb ou de cérium) - éventuellement un ion activateur (sel de

magnésium ou de manganèse).

La présence d'une activité enzymatique se traduit par la libération de phosphate et par la formation d'un précipité de phosphate de plomb ou de phosphate de cérium, opaque aux électrons.

Lorsque le milieu d'incubation doit être sucré, on utilise du saccharose.

#### 2.4.4.1. Mise en évidence des phosphatases neutres.

Pour localiser les activités phosphatasiques neutres, nous avons employé trois substrat différents: l'inosine diphosphate (IDP), la thiamine pyrophosphate (TPP) et le  $\beta$ -glycérophosphate de sodium.

Nous avons également utilisé deux milieux d'incubation différents: le milieu classique de NOVIKOFF et GOLDFISCHER (1961) et le milieu de ROBINSON et KARNOVSKY (1983 a et b) faisant intervenir le cérium comme agent de capture à la place du plomb.

#### La technique est la suivante:

-Les objets sont fixés par le glutaraldéhyde à 2 % dans le tampon cacodylate à pH 7,2 à 0°C pendant 1 heure à 2 heures. Le substrat (1 mg/ml) est ajouté au mélange fixateur. Pour une bonne pénétration du fixateur, nous pratiquons un passage sous vide au début de la fixation. -Ils sont ensuite rincés par le tampon cacodylate sucré à 5% pendant plusieurs heures, puis par l'eau distillée sucrée à 5% pendant 30 mn environ.

Les rinçages sont réalisés à 0°C à raison de plusieurs bains par rinçage.

-Les objets sont mis à préincuber pendant 10 mn dans le milieu sucré sans substrat. Ils sont ensuite mis à incuber dans le milieu complet pendant toute la nuit à 0° C et le lendemain pendant 1 heure à  $37^{\circ}$ C.

-Aprés un lavage soigneux à l'eau distillée, ils sont post-fixés par le tétroxyde d'osmium à 2% dans le tampon cacodylate à pH 7,2 pendant 1 heure à 0°C, puis déhydratés et inclus dans l'Epon.

#### MILIEU DE NOVIKOFF et GOLDFISCHER

-Eau distillée	2,8 ml
-Tampon tris-maléate 0,2M pH 7,2	4 ml
-Solution de chlorure de manganèse à 0,5%	2 ml
-Solution à 1% de nitrate de plomb	1,2 ml
-Substrat	10 mg

#### MILIEU DE ROBINSON et KARNOVSKY (1983)

-Tampon tris-maléate 0,1 M pH 7,2 ..... 10 ml -Substrat ..... 1 mM (soit 4,71 mg pour l'IDP et 4,5 mg pour la TPP) -Chlorure de manganèse 2mM ..... 3.23 mg (soit 1 ml d'une solution mère à 323 mg /100 ml) -Chlorure de cérium 2mM ...... 7,5 mg (soit 1 ml d'une solution mère à 745 mg/100 ml)

Les témoins sont réalisés en supprimant le substrat du milieu d'incubation. En outre, nous avons réalisés des incubations en ajoutant du diéthylstilbestrol (D.E.S.) au milieu d'incubation, afin d'éliminer des réactions de décomposition du substrat par les ATPases.

#### 2.4.4.2. Mise en évidence des phosphatases alcalines.

Pour la mise en évidence des phosphatases alcalines nous avons employé soit le milieu "classique" (GIANINAZZI *et al.* 1979) qui fait intervenir le plomb comme agent de capture, soit le milieu au cérium mis au point par ROBINSON et KARNOVSKY (1983 b).

-Les objets sont fixés par le glutaraldéhyde à 1,6 à 2 % dans le tampon cacodylate à pH 7,2 pendant 1 heure à 0 °C (passage sous vide des objets).

-Ils sont ensuite soigneusement rincés dans le tampon cacodylate sucré à 5% pendant 1 à 2 heures, puis dans l'eau distillée sucrée à 5% pendant 1 heure et enfin dans le tampon tris-maléate à pH 8,5 sucré à 5 % pendant 1 heure également.

-Les objets sont mis à incuber la nuit, à 0°C, dans le milieu de réaction puis, le lendemain, 1 heure à 37°C dans ce même milieu.

-Le matériel est rincé plusieurs fois à l'eau distillée avant d'être post-fixé par le tétroxyde d'osmium à 2% dans le tampon cacodylate à pH 7,2, puis déshydraté et inclus dans l'Epon.

#### MILIEU D'INCUBATION "CLASSIQUE" DES PHOSPHATASES ALCALINES

Dissoudre 0,12 g de nitrate de plomb dans 100 ml de tampon tris-maléate à pH 8,5. Ajouter 10 ml d'une solution de  $\beta$ -glycérophosphate de sodium à 3%. Si la préparation se trouble, la filtrer.

#### MILIEU DE ROBINSON ET KARNOVSKY (1983)

-	Tris-maléate pH 8,5	10 ml
-	<pre>β-glycérophosphate de sodium (1 mM)</pre>	3 mg
	chlorupe de cérium (2mM)	7 5 mo

#### 

#### 2.4.4.3. Mise en évidence de la glucose-6-phosphatase.

Pour localiser la glucose-6-phosphatase nous avons utilisé soit le milieu "classique" faisant intervenir le plomb comme agent de capture, soit le milieu au cérium mis au point par ROBINSON et KARNOVSKY (1983 b). -Les objets sont fixés par le glutaraldéhyde à 1,5% dans le tampon cacodylate à pH 7,2 à la température de la glace fondante. Selon les recommandations de LESKES *et al.* (1971), une petite quantité de substrat (glucose-6-phosphate) est introduite dans le mélange fixateur. Le but de cette opération est d'assurer une protection de l'enzyme (PAPADIMITRIOU et VIAN DUIJN 1970).

Pour une meilleure pénétration des produits, les objets sont passés sous vide au début de la fixation.

-Aprés 1 heure de fixation, les objets sont rincés à l'eau distillée pendant 1 heure, puis par le tampon tris-maléate à pH 6,7 pendant 1/2 heure environ.

-Ils sont ensuite mis à incuber au froid dans le milieu de localisation de la glucose-6-phosphatase pendant 2 à 3 heures, puis à  $37^{\circ}$ C pendant 45 mn à 1 heure.

-Aprés un lavage soigneux par l'eau distillée, les objets sont post-fixés pendant 1 heure par le tétroxyde d'osmium à 2% dans du tampon cacodylate à pH 7,2 à la température de la glace fondante, puis deshydratés et inclus dans l'Epon.

#### MILIEU D'INCUBATION "CLASSIQUE":

Glucose-6-phosphate	25	mg
Eau distillée	27	ml
Tampon tris-maléate pH 6,7 0,4M	20	ml
Nitrate de plomb à 2%	3	ml

#### MILIEU DE ROBINSON ET KARNOVSKY (1983):

Tampon tris-maléate	pH 6,7	10 ml
Glucose-6-phosphate		, >
Chlorure de cérium	2mM 7,5 m	ıg
( soit 1 ml d'une se	olution mère à 745 mg/100 ml)	

Les témoins sont réalisés: - soit en mettant un excès de glucose (5%) dans le milieu d'incubation (ARION et NORDLIE 1964)

- soit en inactivant l'enzyme en chauffant les objets dans le milieu d'incubation porté à ébullition (HUGON et al. 1970, in DARGENT et al. 1982).

# ETUDE DES MYCORHIZES VESICULO - ARBUSCULAIRES D'ESSENCES LIGNEUSES

Etudes cytologiques et cytochimiques

Au cours de ces dernières années, de nombreux travaux ont été réalisés sur l'ultrastructure des mycorhizes à vésicules et arbuscules (SCANNERINI et BELLANDO 1967, 1968; PROTSENKO et al. 1971; SCANNERINI 1972; KASPARI 1973, 1975; COX et SANDERS 1974; OLD et NICOLSON 1975; KINDEN et BROWN 1975 a, b, c, 1976; SCANNERINI et al. 1975; SCANNERINI et BONFANTE-FASOLO 1976, 1979, STRULLU 1976, 1978; BONFANTE-FASOLO et SCANNERINI 1977; 1983; CARLING et al. 1977; BONFANTE-FASOLO 1978; DEXHEIMER et al. 1979; HOLLEY et PETERSON 1979; WALKER et POWELL 1979; BONFANTE-FASOLO et al. 1981; GIANINAZZI-PEARSON et al. 1981; GRIPPIOLO 1981; KARIYA et TOTH 1981; MARX 1981; MORANDI 1981; BONFANTE-FASOLO et FONTANA DEXHEIMER et al. 1982 a; GIANINAZZI 1985; et al. 1983: BONFANTE-FASOLO 1984; PONS 1984; DEXHEIMER et al. 1985 a; 1986 a, b; JACQUELINET-JEANMOUGIN 1986; BOUDARGA et DEXHEIMER 1988; KREUTZ-JEANMAIRE et al. 1988 a, b; BOUDARGA 1989).

Cependant l'essentiel de ces études a porté sur des espèces herbacées et peu d'espèces arborescentes ligneuses ont été étudiées (*Liquidambar*: KINDEN et BROWN 1975 a, b, c, 1976; *Taxus baccata*: STRULLU 1978; *Citrus*: NAGY et NORDBY 1980; *Acer pseudoplatanus*: MARX 1981; *Eucalyptus camaldulensis*: BOUDARGA et DEXHEIMER 1988; BOUDARGA 1989; *Acer saccharum*: YAWNEY et SCHULTZ 1990).

Les mycorhizes à vésicules et arbuscules sont pourtant très répandues chez les espèces arborescentes tropicales (JANSE 1987, ALWIS et ABEYANAKE 1980). Pour BAYLIS (1961), ce serait le type mycorhizien le plus courant des forêts de Nouvelle-Zélande.

De même, chez les Conifères, en dehors des Abiétacées à ectomycorhizes, la plupart des représentants des autres familles forment des mycorhizes à vésicules et arbuscules (HARLEY et SMITH 1983).

Chez les Angiospermes arborescentes, elles ont été observées dans les genres appartenant à des familles très variées (HARLEY et SMITH 1983) tels que Sambucus, Crateagus, Malus, Acer, Liquidambar, Citrus, Salix, Populus, Persea, Khaya.

Il nous est donc apparu comme particulièrement intéressant d'effectuer une étude cytologique fine des mycorhizes à vésicules et arbuscules de quelques essences ligneuses. Nous avons concentré notre effort sur trois essences ligneuses: le merisier, le pommier et le catalpa.

Le merisier (*Prunus avium* L.) et le pommier (*Pirus malus* L.) sont des Rosacées ligneuses susceptibles de former des endomycorhizes à vésicules et arbuscules (PONS 1984 pour *Prunus avium*; GERDEMANN et TRAPPE 1974 pour *Pirus malus*). Certains auteurs signalent également la présence d'ectomycorhizes (HARLEY et SMITH 1983; HARLEY et HARLEY 1987). Nous nous sommes donc intéressée à l'ultrastructure de ces mycorhizes à vésicules et arbuscules obtenues en conditions contrôlées. De plus, la possibilité de prélever des rejets de merisiers sauvages nous a permis d'effectuer des comparaisons entre des mycorhizes obtenues en conditions contrôlées et des mycorhizes naturelles. Sur ce matériel nous avons également réalisé un suivi de ces mycorhizes sur une année de végétation.

Le catalpa (*Catalpa bignonioïdes* Walt.) est une essence ornementale souvent plantée dans les parcs, les jardins et le long des avenues. Elle appartient à une famille tropicale et subtropicale (Bignoniacées) où peu de choses sont connues sur les symbioses mycorhiziennes, le seul genre mentionné dans HARLEY et SMITH (1983) (*Jacaranda*) étant ectomycorhizien. Il paraissait donc intéréssant d'étudier les mycorhizes à vésicules et arbuscules formées sur le système racinaire de cette essence ligneuse.

#### CHAPITRE I

.

.

ETUDE ULTRASTRUCTURALE DES MYCORHIZES A VESICULES ET ARBUSCULES OBTENUES EN CONDITIONS CONTROLEES CHEZ DEUX ESPECES DE ROSACEES LIGNEUSES

#### ETUDE ULTRASTRUCTURALE DE MYCORHIZES A VESICULES ET ARBUSCULES OBTENUES EN CONDITIONS CONTROLEES CHEZ DEUX ESPECES DE ROSACEES LIGNEUSES (Prunus avium L. et Pirus malus L.)

#### 1. INTRODUCTION.

Dans ce chapitre sont présentés les résultats concernant l'organisation ultrastructurale des mycorhizes à vésicules et arbuscules obtenues en conditions contrôlées sur les deux Rosacées ligneuses.

Nous rappelons que pour le merisier (*Prunus arium L.*) ces études ont été réalisées à partir de vitroplants confrontés en conditions contrôlées avec *Glomus mosseae* et *Glomus intraradices*. Les pommiers (*Pirus malus L.*) sont issus de semis et infectés

par Glomus intraradices.

La plupart des travaux sur l'ultrastructure des mycorhizes à vésicules et arbuscules s'intéressent essentiellement aux structures fongiques. Les données concernant le cytoplasme de la plante-hôte sont peu nombreuses et fragmentaires. Aussi, sans pour autant négliger l'évolution du champignon, nous insisterons particulièrement sur les modifications affectant le cytoplasme des cellules de l'hôte au cours de l'infection.

Nous n'avons pas observé de différences significatives dans l'organisation des mycorhizes obtenues pour les différents couples symbiotiques. Dans la présentation de nos résultats, les mycorhizes de pommier et de merisier seront donc traitées simultanément.

#### 2. ETUDE MORPHOLOGIQUE EN MICROSCOPIE PHOTONIQUE.

Les observations en microscopie photonique de fragments de racines colorés par le bleu trypan ou de coupes semi-minces, ont montré que certaines racines courtes peuvent être fortement infectées (Planche 1, fig. 1) alors que d'autres ne présentent pas d'endophyte.

De plus sur une même racine, l'infection n'apparaît pas sur toute la longueur, il y a juxtaposition de zones infectées et non infectées. La coloration par le bleu Trypan permet de mettre en évidence la pénétration des hyphes externes dans la racine (Planche 1, fig. 2), où elles établissent un réseau d'hyphes intercellulaires. Les vésicules, caractéristiques des associations V.A. sont également bien visibles par cette technique (Planche 1, figs. 1 et 2).

Sur les coupes semi-minces de mycorhizes colorées par le bleu de toluidine, le champignon ne présente pas une répartition uniforme dans la racine: il est absent de l'endoderme et du cylindre central, et seul le cortex renferme l'endophyte.

D'une manière plus précise, l'organisation du champignon dans le cortex n'est pas uniforme:

- la zone corticale externe est caractérisée par la présence d'hyphes intercellulaires de gros diamètre. A ce niveau les rares hyphes intracellulaires forment des pelotons mycéliens (Planche 1, fig. 3).

- la zone corticale interne renferme des hyphes intercellulaires et des arbuscules reconnaissables aux très nombreuses sections d'hyphes de diamètre varié. Les arbuscules sont observés jusque dans la couche de cellules corticales la plus profonde, au contact de l'endoderme (Planche 1, fig.4).

#### 3. ETUDES CYTOLOGIQUES EN MICROSCOPIE ELECTRONIQUE.

Une mycorhize à vésicules et arbuscules présente une structure complexe puisqu'elle comprend des hyphes externes diffuses dans le substrat, un réseau d'hyphes intercellulaires, des arbuscules, des pelotons et des vésicules.

Dans cette étude, nous nous sommes essentiellement intéressée aux structures intraracinaires, à l'exclusion des vésicules.

#### 3.1. LES HYPHES INTERCELLULAIRES.

Après pénétration dans la racine, les hyphes intercellulaires progressent par les méats ménagés entre les cellules du parenchyme cortical (Planche 2, figs. 2 et 3). Plus rarement, elles s'insinuent directement entre les cellules dont elles dissocient la lamelle moyenne et écartent les parois primaires (Planche 2, fig. 1). Elles présentent toujours un diamètre important (5 à 6  $\mu$ m).

Le cytoplasme des hyphes intercellulaires peut accumuler du glycogène (Planche 2, fig. 1; Planche 3, figs. 1 et 6). Ce cytoplasme est souvent vacuolisé et renferme une multitude de petites vacuoles arrondies, bien individualisées et séparées par leur tonoplaste (Planche 2, fig. 3). Parfois, elles montrent un granule de polyphosphate (Planche 2, fig. 3; Planche 3, fig.3). Dans les mycorhizes de merisier, les hyphes intercellulaires, en général peu nombreuses, ne sont pas libres dans les méats mais sont appliquées sur la surface externe des parois cellulaires (Planche 2, fig. 3; Planche 3, fig. 4).

Le test PATAg montre un accolement très étroit, sans hiatus, entre la paroi des cellules de l'hôte et les hyphes intercellulaires (Planche 2, fig. 1; Planche 4, fig.1). Le reste de la lumière du méat apparaît vide, ou tout au plus traversé de quelques fibrilles polysaccharidiques (Planche 2, fig. 1; Planche 4, fig. 1), et les hyphes semblent indépendantes les unes des autres.

#### Deux types d'interfaces sont rencontrés. (Schéma 1 p.25)

- Un (type IT 8, schéma 4 p.31) pour la partie accolée des hyphes à la cellule-hôte, et qui comprend:

- le plasmalemme du champignon,
- la paroi fongique,
- la paroi de la cellule corticale,
- le plasmalemme de cette cellule

L'autre (type IT 13, schéma 4 p.31) pour la partie libre des hyphes vers la lumière du méat, et qui est formé par: le plasmalemme du champignon, la paroi fongique, la lumière du méat avec quelques fibrilles, les parois des cellules corticales bordantes, le plasmalemme de ces cellules.

Dans les mycorhizes de pommier, nous avons observé une différence dans l'organisation du réseau d'hyphes intercellulaires et, une évolution de ce dernier parallèle à celle des arbuscules intracellulaires.

Dans les zones où les cellules corticales renferment des arbuscules vivants, les hyphes intercellulaires, toujours localisées dans les méats, sont peu nombreuses. Elles sont noyées dans une substance d'aspect dense qui remplit presque toute la lumière du méat et qui ne réagit pas aux tests de mise en évidence des polysaccharides (Planche 3, fig. 1) et des protéines (Planche 3, fig. 2). Nous n'avons pu préciser la nature de cette substance.

Toutefois, nous avons remarqué dans cette masse dense, la présence de zones claires faiblement réactives (Planche 3, figs. 1 et 2) qui correspondent à des fibrilles incluses dans la substance dense.

Dans les zones où les cellules corticales renferment des arbuscules dégénérescents ou morts, les hyphes, toujours enrobées dans une substance dense, sont plus abondantes et peuvent occuper la totalité de la lumière des méats (Planche 3, figs. 5 et 6). Trois types d'interface sont rencontrés. (schéma 1 p.25)

- L'interface entre la partie accolée des hyphes et les cellules corticales est identique à celle décrite pour le merisier (type IT 8, schéma 4 p. 31).

- Par contre l'interface avec la lumière du méat est modifiée, le vide étant remplacé par la substance dense (type IT 13, schéma 4 p.31).

- Enfin, compte tenu de l'abondance des hyphes, il se crée des interfaces entre les hyphes (type IT 40, schéma 4 p.31) comprenant :

le plasmalemme d'une hyphe, sa paroi, la paroi d'une autre hyphe, le plasmalemme de cette autre hyphe.

Parfois, entre les deux parois fongiques se glisse une lame plus ou moins importante de substance dense. L'interface précédente se modifie alors pour devenir (type IT 41, schéma 4):

le plasmalemme d'une hyphe, sa paroi, une couche de substance dense, la paroi d'une autre hyphe, le plasmalemme de cette autre hyphe.

Dans la zone de contact entre les hyphes intercellulaires et les cellules de l'hôte, nous avons régulièrement observé un aspect crénelé de la surface externe de la paroi fongique, qui semble émettre des protubérances se fixant sur les cellules de l'hôte. Ce phénomène est particulièrement net dans les mycorhizes de pommier (Planche 3, figs. 2 et 3), où une couche de substance opaque aux électrons tapisse le méat.

Dans ce cas, les émissions des parois fongiques traversent cette couche pour venir au contact de la paroi des cellules de l'hôte. Elles semblent constituer des points d'ancrage privilégiés.

Enfin, pour le pommier, dans les zones infectées âgées contenant des hyphes dégénérescentes ou mortes, nous avons observé des proliférations internes (Planche 10, figs. 4 et 5). De jeunes hyphes poussent à l'intérieur d'hyphes vidées de leur contenu cytoplasmique, elles apparaissent alors avec plusieurs structures pariétales concentriques. Nous n'avons jamais observé ces hyphes vivantes sortir hors du "tube" constitué par les parois des hyphes précédentes, ce qui semble indiquer un confinement de ces proliférations.
SCHEMA 1: HYPHES INTERCELLULAIRES DIVERS TYPES D'INTERFACES



matériel dense occupant les espaces entre les hyphes et les cellules de l'hôte

E = ENDOPHYTE H = CELLULE CORTICALE DE L'HOTE

1) Interface constituée de la juxtaposition étroite des parois fongiques et des parois des cellules de l'hôte.

2) Interface présentant une lame de matériel dense séparant le champignon des parois des cellules de l'hôte. La paroi fongique émet des protubérances crénelées qui fixent les hyphes sur les parois des cellules corticales (flèches).

3) Interface au niveau d'un méat vide.

4) Interface au niveau d'un méat rempli de matériel dense.

5) Interface entre hyphes intercellulaires.

6) Interface entre hyphes intercellulaires avec du matériel dense d'enrobage.

#### 3.2. STRUCTURES ARBUSCULAIRES: ETABLISSEMENT ET DEGENERESCENCE .

Les cellules de l'hôte qui ne renferment pas d'endophyte sont très vacuolisées et, leur cytoplasme est réduit à une mince pellicule pariétale (Planche 2, figs. 1 et 2).

La pénétration du champignon dans une cellule s'effectue à partir d'une ramification latérale émise par une hyphe intercellulaire (Planche 3, fig. 1; Planche 4, fig. 3) qui perfore la paroi de l'hôte.

Ce processus de pénétration débute par l'accolement étroit d'une hyphe contre la paroi de la cellule-hôte et l'altération de la structure pariétale qui paraît se désagréger dans la zone de contact (Planche 4, fig. 1).

Puis la paroi désorganisée dont la résistance mécanique est diminuée, est refoulée par l'hyphe qui pénètre dans la cellule (Planche 4, fig. 2). Le plasmalemme de la cellule-hôte n'est jamais rompu (Planche 3, fig. 1).

Dans l'hyphe de pénétration, le noyau occupe une position apicale comme s'il dirigeait la croissance (Planche 4, fig. 2). Enfin, au niveau de la perforation, dans la zone de contact entre l'hyphe et la paroi de la cellule-hôte, nous avons observé, de manière constante, dans les hyphes, la présence de corps multivésiculaires (Planche 4, fig. 2).

Dans le stade initial de la colonisation d'une cellule, l'hyphe de pénétration ou "tronc de l'arbuscule" est peu ramifiée, et ne produit que quelques branches de gros diamètre. L'organisation de la cellule-hôte est peu modifiée (Planche 4, fig. 3) puisque la vacuole occupe encore une grande partie du volume cellulaire. Les hyphes intracellulaires se ramifient ensuite abondamment et forment un système de branches finement divisées qui constituent l'arbuscule (Planche 4, fig. 4). L'extrémité des branches ultimes montre souvent un cytoplasme dense de caractère juvénile. Dans les portions plus âgées de l'arbuscule, le cytoplasme se vacuolise et contient de très nombreuses petites vacuoles rondes restant bien individualisées, caractéristiques des Endogonacées.

Au cours de l'édification des structures intracellulaires, si la paroi est perforée, le plasmalemme n'est jamais rompu. Les hyphes de l'arbuscule sont donc séparées du cytoplasme de la cellule-hôte par une membrane plasmalemmique (Planche 5, fig. 4). Elles restent toujours dans l'espace périplasmique dont l'expansion forme la matrice (schéma 2 p.28). Sur toute la surface développée autour de l'arbuscule, cette membrane présente une nette affinité pour l'acide phosphotungstique (Planche 7, fig. 1) qui est un bon marqueur du plasmalemme.

Il semble évident que la surface du plasmalemme qui borde les branches de l'arbuscule est bien supérieure à celle du plasmalemme difficile périphérique de la cellule-hôte. Comme il est d'apprécier une surface sur des sections de cellules, nous avons réalisé des mesures de longueur. Sur le cliché n° 4 (Planche 4) nous avons trouvé que la longueur du plasmalemme qui entoure les branches de l'arbuscule est 6 fois plus importante que celle du plasmalemme périphérique. Ceci confirme que la surface de la membrane périsymbionte est plus importante que celle du plasmalemme périphérique. Cette surface est encore accrue par la présence de formations plasmalemmiques, souvent de grande taille, qui peuvent être de formes diverses et présenter des structures tubulaires, vésiculaires (Planche 5, fig. 5) ou un empilement concentrique de membranes (Planche 5, fig. 4).

L'interface entre les hyphes intracellulaires et la cellule-hôte comprend le plasmalemme de l'hôte, la matrice, la paroi et le plasmalemme du champignon (schéma 3 p.29).

Nous avons précisé l'organisation de cette interface à l'aide des techniques cytochimiques classiques comme le test PATAg de mise en évidence des polysaccharides ou la coloration des protéines de SWIFT.

La paroi des hyphes arbusculaires est fortement marquée par le test PATAg et la réaction de SWIFT (Planche 6, figs. 1 à 3; Planche 3, fig. 4).

Le plasmalemme de l'hôte et les formations plasmalemmiques sont aussi marqués (Planche 5, fig. 5) par le test PATAg qui révèle de nombreuses fibrilles polysaccharidiques semblant associées à ces formations plasmalemmiques (Planche 6, fig. 1).

Les membranes qui forment les plasmalemmasomes du champignon sont également fortement marquées (Planche 6, figs. 3 et 4) mais elles ne paraissent pas associées à des fibrilles polysaccharidiques.

La matrice de l'interface n'est pas un espace vide. Sur les coupes contrastées par l'acétate d'uranyle et le citrate de plomb, il est déjà possible d'y observer des amas fibrillaires, de nombreuses formations d'origine plasmalemmique de forme vésiculaire ou tubulaire, et de fins tubules semblant relier le plasmalemme et la paroi fongique (Planche 5, figs.3 et 4; Planche 7, fig. 2; Planche 8, fig. 3).

Les amas fibrillaires et d'une manière plus générale toutes les formations de la matrice (Planche 6, figs. 1, 2, 4 et 6) sont fortement marqués par le test des polysaccharides et la réaction de SWIFT. La double réactivité des fibrilles est l'indication d'une nature glycoprotéique. SCHEMA 2: PENETRATION DE L'ENDOPHYTE DANS LA CELLULE-HOTE.



Une hyphe intercellulaire de l'endophyte (1) émet une ramification (1') qui perfore la paroi de la cellule-hôte (2). Le plasmalemme de l'hôte (3) n'est pas rompu, et la matrice (4) qui entoure les hyphes intracellulaires est en continuité avec l'espace périplasmique (5). Le champignon ne pénètre donc jamais dans la cellule et reste confiné dans l'apoplasme.

Les hyphes intracellulaires sont recouvertes d'une couche d'isolement (6) produite par la cellule-hôte.

# SCHEMA 3: HYPHES INTRACELLULAIRES DIVERS TYPES D'INTERFACES



Toutes les interfaces sont limitées, d'un côté, par le plasmalemme du champignon, de l'autre par la membrane périsymbionte de l'hôte (=plasmalemme).

1) Interface des grosses branches de l'arbuscule. La couche d'isolement est particulièrement importante et dense.

2) Interface des petites branches de l'arbuscule. La couche d'isolement est réduite à des fibrilles diffuses.

3) Interface des hyphes des pelotons en contact avec la vacuole. La couche d'isolement est dense. Le cytoplasme est peu important et le tonoplaste est très proche de la membrane perisymbionte.

4) Interface des hyphes des pelotons en contact avec la paroi cellulaire de l'hôte.

Autour des fines branches de l'arbuscule, ces fibrilles glycoprotéiques paraissent soit libres dans la matrice, soit fixées par une extrémité sur le plasmalemme de l'hôte ou sur la paroi du champignon (Planche 6, fig. 1). Elles forment alors une auréole plus ou moins dense autour des hyphes. C'est la couche d'isolement, classique dans ce type de mycorhize, qui est continue et bien individualisée autour des grosses branches (Planche 6, figs. 2, 5), ou réduite à un halo plus ou moins distinct autour des branches les plus fines (Planche 6, figs. 1,6; schéma 3 p.29). Les interfaces sont différentes et l'on distingue le type IT 21 pour les grosses branches et le tronc, et le type IT 24 pour les fines branches (schéma 4 p.31).

Dans les mycorhizes de ces deux espèces ligneuses, les arbuscules se rencontrent surtout dans les couches profondes du cortex, à proximité du cylindre central (Planche 4, fig. 3).

Chez le pommier, ce phénomène est particulièrement net, et nous avons souvent observé des arbuscules dans des cellules directement en contact avec l'endoderme (Planche 4, fig. 3; Planche 9, figs. 5 et 6).

Parfois, l'endophyte tente de forcer la barrière endodermique. Mais l'hôte semble réagir en déversant dans les méats un matériel dense, marqué par le test PATAg et donc contenant une fraction polysaccharique, qui bloque la progression du champignon (Planche 9, figs. 5 et 6). Au niveau de la perforation de la paroi cellulaire, nous observons dans le cytoplasme fongique la présence d'un corps multivésiculaire (Planche 9, fig. 6).

La dégénérescence de l'arbuscule est marquée par la désorganisation et la disparition du cytoplasme des branches les plus fines, puis des grosses branches (Planche 4, fig. 5) et finalement du tronc. Lorsque le cytoplasme a disparu, il ne subsiste que les parois effondrées des hyphes (Planche 4, fig. 6; Planche 5, fig. 2; Planche 8, fig. 2) qui sont toujours très réactives.

Les restes fongiques sont encapsulés dans un matériel fibrillaire marqué par le test PATAg (Planche 5, fig. 2; Planche 8, fig. 2) et la réaction de SWIFT (Planche 10, fig. 3). Ils sont inclus dans une matrice commune qui forme une sorte de poche dans la cellule (Planche 5, fig. 2; Planche 8, fig. 2). Au sein de cette masse d'hyphes mortes, nous avons souvent observé des éléments membranaires présentant une structure tripartite (Planche 5, fig. 1) dérivant probablement des formations plasmalemmiques de l'hôte.

Dans une cellule renfermant un arbuscule mort, l'interface comprend: la membrane périsymbionte, la matrice, le matériau polysaccharidique d'encapsulement équivalent à la couche d'isolement, la paroi fongique. Cette interface est à rattacher au type IT 25 (schéma 4 p.31). SCHEMA 4: DIFFERENTS TYPES D'INTERFACE DANS LES MYCORHIZES, MODELE ADAPTE DE BRACKER ET LITTLEFIELD (1973)

symboles:	cytoplasme du champignon					
	cytoplasme de l'hôte					
	cytoplasme fongique mort ou dégénérescent					
	plasmalemme					
	paroi fongique					
	paroi de la cellule-hôte					
	couche d'apposition					
	matériel polysaccharidique dérivant de . l'hôte, du champignon ou des deux					

# HYPHES INTERCELLULAIRES

INTERFACE HYPHE/CELLULE-HOTE



# HYPHES INTRACELLULAIRES

INTERFACE PETITE BRANCHE ARBUSCULE/CELLULE-HOTE

ΙT	24								
		Ε	Ε	E		н	н		

Δ.

INTERFACE GROSSE BRANCHE ARBUSCULE/CELLULE-HOTE

INTERFACE ARBUSCULE MORT/CELLULE-HOTE

IT 25 E E H H

# <u>3.3. Les modifications cytoplasmiques dans les cellules infectées.</u>

L'établissement d'un arbuscule provoque de nombreuses modifications dans une cellule hôte.

Dans une cellule sans endophyte, le cytoplasme est réduit à une mince pellicule pariétale, l'essentiel du volume cellulaire étant occupé par la vacuole (Planche 2, figs. 1 et 2).

Dans une cellule renfermant un arbuscule vivant, le volume cytoplasmique s'accroît considérablement (Planche 4, fig. 4) et l'appareil vacuolaire se morcelle et régresse.

Le cytoplasme de la cellule-hôte est très dense et contient de nombreux organites (Planche 5, fig. 3; Planche 7, figs. 3 et 4).

#### 3.3.1. Les mitochondries.

Dans une cellule infectée, leur nombre s'est accru par rapport à une cellule corticale sans endophyte où on ne peut observer que de rares mitochondries. Elles forment parfois des groupements importants à proximité des sections des branches de l'arbuscule. Elles montrent toujours un système de crêtes bien développé (Planche 7, fig. 4; Planche 8, fig. 1) et une matrice relativement dense.

# 3.3.2. Les plastes.

Les plastes des cellules corticales non infectées présentent un stroma dense renfermant 4 à 6 gros grains d'amidon (Planche 3, fig. 5).

Dans les mycorhizes de pommier ou de merisier, ces plastes subissent des transformations remarquables. Ils se présentent sous une forme très allongée aux contours lobés (Planche 7, fig. 6; Planche 8, figs. 1 et 3). Sur des sections transversales, cette forme sinueuse peut donner l'image d'une structure plus ramassée (Planche 6 fig. 5; Planche 7, fig. 5).

Leur stroma apparait dense aux électrons. On observe la présence d'éléments tubulaires sombres et de plastoglobules (Planche 7, fig. 4; Planche 8, fig. 3).

Ces plastes sont des leucoplastes.

La structure interne de ces plastes est particulièrement bien révélée par le test de mise en évidence des polysaccharides. Les plastoglobules sont marqués (Planche 7, fig. 6), leur nombre est variable suivant les sections. Le stroma de ces leucoplastes contient un système complexe de fins tubules (Planche 7, fig.: 6; Planche 8, fig. 1), dont les plus fins ne sont pas contrastés par le test PATAg, tandis que d'autres plus nombreux et d'un diamètre plus important sont très réactifs (Planche 7, fig. 6; Planche 8, fig. 1). Nous avons observé des connections entre ces deux types de tubules (Planche 7, fig. 6; Planche 8, fig. 1). Il doit s'agir d'un même système ayant des fonctions différentes. Les tubules à contenu sombre semblent accumuler une substance dense évoluant ensuite en plastoglobules.

Les leucoplastes évoluent en amyloplastes lorsque l'arbuscule meurt (Planche 8, fig. 2). Ces amyloplastes sont d'une taille inférieure à ceux des cellules corticales non infectées (Planche 3, fig. 5; Planche 10, fig. 5).

Nous n'avons jamais observé d'amyloplastes dans des cellules abritant un arbuscule vivant.

#### 3.3.3. L'appareil de Golgi.

Les dictyosomes sont peu abondants. Ils sont formés par l'empilement de 5 à 6 saccules. Ils présentent une face de formation et une face de sécrétion (Planche 7, fig. 3; Planche 8, fig. 1) qui émet quelques vésicules.

Le test PATAg révèle la présence de rares fibrilles polysaccharidiques dans les vésicules de sécrétion.

#### 3.3.4. Le réticulum endoplasmique.

Le réticulum endoplasmique est très développé. Il est soit disposé sous forme de longues travées, souvent parallèles, et qui entourent les branches de l'arbuscule (Planche 7, fig. 4), soit sous forme d'un réseau de tubules (Planche 7, fig. 3).

Les membranes du réticulum endoplasmique sont bordées de polysomes qui sont également abondants dans le hyaloplasme (Planche 7, figs. 3 et 4).

Nous avons observé de nombreux contacts entre les travées du réticulum endoplasmique et le plasmalemme de l'hôte qui borde l'interface (Planche 7, fig. 6; Planche 8, fig. 4; Planche 9, figs. 1 et 2). Les travées réticulaires sont alors légèrement renflées et dépourvues de ribosomes (Planche 8, fig. 5; Planche 9, figs. 1 et 2).

La lumière de ces travées contient des composés amorphes marqués qui réagissent au test des polysaccharides. Le contenu de ces travées semble passer dans la matrice (Planche 9, fig. 2).

#### 3.3.5. L'appareil vacuolaire.

Dans une cellule sans endophyte, la vacuole se trouve en position centrale et occupe pratiquement tout le volume cellulaire (Planche 2, figs 1 et 2).

Dans une cellule infectée, le système vacuolaire subit un remaniement important puisqu'il se morcelle et régresse. Lorsque l'arbuscule est bien développé, l'appareil vacuolaire est très réduit et n'est plus représenté que par quelques petites vacuoles (Planche 4, fig. 4).

La dégénérescence des branches de l'arbuscule puis du tronc, s'accompagne d'un accroissement du volume cytoplasmique et de la régression du cytoplasme (Planche 4, figs. 5 et 6).

#### 3.3.6. Le noyau.

Dans les cellules infectées, le noyau apparaît plus gros que dans les cellules dépourvues d'endophyte. Il peut présenter un aspect lobé et venir entourer les branches de l'arbuscule (Planche 9, fig. 4).

La chromatine est répartie en amas dans un nucléoplasme finement granuleux (Planche 9, fig. 3).

#### 3.4. LES PELOTONS.

Comme nous l'avons déjà signalé dans notre étude en microscopie photonique, d'autres formations intracellulaires, les pelotons, sont observées dans les assises superficielles du cortex racinaire. Ils se présentent comme des hyphes de diamètre important, enroulées dans une cellule.

Les observations en microscopie électronique (Planche 10, fig. 1) confirment que les cellules contiennent des hyphes de fort diamètre qui ne sont pas ramifiées.

La réaction de la cellule à la formation d'un peloton est moins importante que lorsqu'il se forme un arbuscule.

En particulier, l'appareil vacuolaire reste toujours bien développé, et le cytoplasme ne s'accroît pas de manière sensible. De ce fait, les hyphes sont recouvertes seulement d'un mince film cytoplasmique avec peu d'organites visibles. Le plasmalemme de l'interface est souvent très proche du tonoplaste de la vacuole qui nous paraît devoir être incluse dans la structure interfaciale (Planche 10, fig. 1).

Les plastes renferment de gros grains d'amidon.

La paroi fongique est doublée d'une couche polysaccharidique (Planche 10, fig. 2). Cette dernière peut être commune à plusieurs hyphes si elles sont accolées (Planche 10, fig. 1).

Les hyphes du peloton peuvent se trouver au centre de la cellule ou en position pariétale.

Nous pouvons distinguer deux types d'interface (schéma 3 p.29, schéma 4 p.31)

- l'un pour la partie des hyphes en contact avec la paroi cellulaire et qui comprend: le plasmalemme du champignon,

sa paroi, une couche d'isolement, la paroi de la cellule-hôte.

- l'autre pour la partie des hyphes en contact avec la vacuole et qui est formé par: le plasmalemme du champignon,

sa paroi, une couche d'isolement, la matrice,

le plasmalemme de l'interface,

un mince film cytoplasmique,

le tonoplaste et la vacuole.

Nous avons observé la formation de pelotons dans des cellules renfermant un arbuscule mort (Planche 4, fig. 6; Planche 10, fig. 3). Les hyphes intercellulaires présentent une double paroi, témoin de la succession de deux vagues d'infection.

#### 4. DISCUSSION ET CONCLUSION.

Les mycorhizes de pommier et de merisier sont typiquement des endomycorhizes à vésicules et arbuscules.

Elles présentent de nombreuses caractéristiques communes avec les associations du même type qui ont été étudiées dans des espèces herbacées ou ligneuses (SCANNERINI et BELLANDO 1967, 1968; PROTSENKO et al., 1971; SCANNERINI 1972; KASPARI 1973, 1975; COX et SANDERS 1974; OLD et NICOLSON 1975; KINDEN et BROWN 1975 a,b,c, 1976; SCANNERINI et al. 1975; SCANNERINI et BONFANTE-FASOLO 1976, 1979, 1983; STRULLU 1976,1978; BONFANTE-FASOLO et SCANNERINI 1977; CARLING et al. 1977; BONFANTE-FASOLO 1978; DEXHEIMER et al. 1979; HOLLEY et PETERSON 1979; WALKER et POWELL, 1979; BONFANTE-FASOLO et al. 1981; GIANINAZZI-PEARSON et al. 1981; GRIPPIOLO 1981; KARIYA et TOTH 1981; MARX 1981; MORANDI 1981; BONFANTE-FASOLO 1984; BONFANTE-FASOLO et FONTANA 1985; DEXHEIMER et al. 1982 a; GIANINAZZI et al. 1983; PONS 1984; DEXHEIMER et al. 1985 a, 1986; JACQUELINET-JEANMOUGIN 1986; BOUDARGA et DEXHEIMER 1988, KREUTZ-JEANMAIRE et al. 1988 a,b; BOUDARGA 1989; YAWNEY et SCHULTZ 1990). Cependant, nous avons aussi observé des différences concernant, en particulier, le réseau d'hyphes intercellulaires.

Grâce à l'utilisation de mycorhizations contrôlées, nous avons pu disposer d'un matériel standardisé nous permettant d'effectuer une étude séquentielle de l'établissement d'une mycorhize à vésicules et arbuscules dans une racine.

C'est cette dynamique d'installation et d'évolution que nous allons présenter, en discutant chaque étape.

## \* La pénétration des hyphes externes dans la racine

Le stade initial de la formation de la mycorhize est la pénétration dans la racine d'une hyphe venant du sol. Nous n'avons pas observé ce stade, mais il a été décrit par plusieurs auteurs. La pénétration peut se faire suivant trois modalités: soit l'hyphe passe par un poil absorbant, soit elle forme un appresoria et pénètre dans la première couche cellulaire (BOULLARD 1968; SCANNERINI et BONFANTE-FASOLO 1982) ou encore, l'hyphe infestante s'accroche à la surface des cellules superficielles de la racine puis s'insinue entre deux cellules épidermiques (JACQUELINET-JEANMOUGIN 1986, chez *Gentiana lutea*).

Il ne semble pas qu'au cours de ce processus initial il s'établisse des mécanismes de reconnaissance du type de ceux qui ont été décrits dans les mycorhizes éricoïdes (BONFANTE-FASOLO 1984) ou plus récemment dans les ectomycorhizes (LEI 1988); ce qui est probablement à relier avec l'absence de spécificité de l'infection endomycorhizienne à vésicules et arbuscules.

#### \* <u>Les hyphes intercellulaires</u>

Après la pénétration dans la racine, les hyphes colonisent les méats intercellulaires et établissent un réseau d'hyphes "intercellulaires". Elles édifient ainsi un réseau à partir du point d'infection.

Le champignon reste toujours confiné dans le cortex racinaire et ne franchit jamais l'endoderme. Les divers travaux effectués sur ce type de mycorhize ne donnent aucune précision sur les mécanismes qui bloquent le champignon au niveau de l'endoderme. Nous avons observé dans les mycorhizes de pommier, des tentatives de franchissement de la barrière endodermique par des hyphes s'insinuant entre les cellules. La plante-hôte réagit en émettant dans le méat des substances qui paraissent bloquer la progression du champignon. Ainsi, à la barrière passive présentée par les cellules de l'endoderme, vient s'ajouter une réaction active de la racine pour prévenir tout envahissement du cylindre central.

Suivant les associations et le degré d'évolution des mycorhizes, nous avons observé des aspects différents du réseau d'hyphes intercellulaires.

Chez le merisier mycorhizé par Glomus intraradices et Glomus mosseae, comme cela a été décrit dans la plupart des associations de ce type (SCANNERINI et BELLANDO 1967, 1968; PROTSENKO et al. 1971; SCANNERINI 1972; KASPARI 1973, 1975; COX et SANDERS 1974; OLD et NICOLSON 1975; KINDEN et BROWN 1975 a,b,c; 1976; SCANNERINI et al. 1975; SCANNERINI et BONFANTE-FASOLO 1976, 1979, 1983; STRULLU 1976, 1978; BONFANTE-FASOLO et SCANNERINI 1977; CARLING et BONFANTE-FASOLO 1978; DEXHEIMER et al. 1979; HOLLEY et al. 1977: PETERSON 1979; WALKER et POWELL 1979; BONFANTE-FASOLO et al. 1981; GIANINAZZI-PEARSON et al. 1981; GRIPPIOLO 1981; KARIYA et TOTH 1981; MARX 1981; MORANDI 1981; BONFANTE-FASOLO et FONTANA 1985; 1982 a; 1983; DEXHEIMER et al. GIANINAZZI et al. PONS 1984: BONFANTE-FASOLO 1984; DEXHEIMER 1985 et al. 1986; a; DEXHEIMER JACQUELINET-JEANMOUGIN 1986; BOUDARGA  $\mathbf{et}$ 1988: KREUTZ-JEANMAIRE et al. 1988 a,b; BOUDARGA 1989), les hyphes intercellulaires forment un réseau peu dense dans les méats dont la lumière reste vide.

Au contraire, chez le pommier mycorhizé par *Glomus intraradices*, la lumière des méats est occupée par une substance dense, dont nous n'avons pu préciser la nature et dans laquelle nous avons mis en évidence une fraction glycoprotéique.

Les hyphes intercellulaires sont souvent étroitement appliquées sur la paroi des cellules qui bordent le méat. Ce contact n'est par fortuit mais correspond à un ancrage des hyphes sur les cellules de l'hôte. En effet, lorsque le méat est tapissé d'une couche d'une substance qui isole les parois, comme chez le pommier, le champignon émet des protubérances qui traversent cette fixent le champignon sur la paroi. Ce phénomène couche et d'accrochage, peu observé, a toutefois déjà été signalé par SERRIGNY (1985). C'est l'indication qu'il existe une interaction entre les hyphes intercellulaires et la paroi des cellules de l'hôte. Les méats intercellulaires ne sont pas simplement une voie de passage inerte, puisqu'il y a mise en oeuvre d'un processus de fixation du champignon sur la surface cellulaire.

Enfin, et plus particulièrement dans les mycorhizes de pommier, la densité du réseau d'hyphes intercellulaires est beaucoup plus forte dans les parties âgées, ne contenant que des arbuscules morts.

#### \* Localisation des arbuscules dans la racine

Dans les mycorhizes de pommier et de merisier, les arbuscules particulièrement abondants dans les cellules sont des assises profondes corticales proches l'endoderme. de Une telle localisation est classique et a déjà été signalée par de nombreux (KINDEN et BROWN 1975 a; STRULLU 1978: auteurs MARX 1981: BONFANTE-FASOLO 1984; BOUDARGA 1989).

Nous en proposons l'explication suivante. Dans une racine, en particulier chez les végétaux ligneux, les assises corticales les plus externes sont rapidement dégénérescentes et donc incapables de réagir à l'infection par le champignon. C'est d'ailleurs dans ces couches que nous avons observé, après d'autres auteurs (KINDEN et BROWN 1975 a et b; BONFANTE-FASOLO et SCANNERINI 1977; BONFANTE-FASOLO 1978; SWARD 1978; MARX 1981; BONFANTE-FASOLO 1984; BONFANTE-FASOLO et FONTANA 1985; JACQUELINET-JEANMOUGIN 1986; BOUDARGA 1989), la présence de pelotons qui ne semblent pas induire une réaction très importante dans la cellule. Au contraire, les cellules des couches profondes restent vivantes et actives; elles réagissent à la présence du champignon qui forme les arbuscules.

D'autre part, les photosynthétats et les éléments nutritifs utilisés par le champignon arrivent par le cylindre central. Il semble tout à fait logique que l'endophyte s'installe le plus près possible du point d'arrivée de ces nutriments, d'autant que les tentatives de franchissement de l'endoderme semblent indiquer un tropisme de ce dernier vers la source alimentaire.

# \* La pénétration de l'endophyte dans une cellule corticale

La pénétration de l'endophyte dans une cellule corticale se fait à partir d'une ramification d'une hyphe intercellulaire. Beaucoup plus rarement, nous avons observé le passage direct d'une hyphe d'une cellule à l'autre. Ce phénomène semble courant pour quelques autres mycorhizes à vésicules et arbuscules (GRIPPIOLO 1981) comme celles de *Gentiana lutea*, où JACQUELINET-JEANMOUGIN (1986) n'a pas observé d'hyphes intercellulaires.

Toutefois, dans la plupart des mycorhizes de type V.A., la pénétration se fait à partir des hyphes intercellulaires comme nous l'avons observé.

Pour certains auteurs, la perforation de la paroi et la pénétration de l'endophyte dans une cellule corticale est uniquement mécanique (HOLLEY et PETERSON 1979). HARLEY et SMITH (1983) semblent aussi se rallier à cette hypothèse.

auteurs pensent que des enzymes fongiques peuvent D'autres modifier la structure de la paroi de l'hôte. C'est préalablement ainsi que MOSSE (1962) suggère que des pectinases faciliteraient KINDEN et BROWN (1975 b et c) pénétration. décrivent une la modification de l'aspect de la lamelle moyenne devant la progression du champignon, comme si ce dernier émettait des enzymes lytiques. Enfin, JACQUELINET-JEANMOUGIN a remarqué au niveau des points de pénétration d'hyphes externes dans la racine, une zone d'éclaircissement du matériel pariétal de la plante-hôte.

L'ensemble de ces observations indique que, au moins localement, à l'apex des hyphes en croissance, il y a excrétion d'enzymes capables de modifier la structure de la paroi.

Nos observations, notamment chez le merisier, confirment ces interprétations. En effet, nous avons observé, au point de contact entre l'amorce d'une hyphe pénétrante et la paroi, une modification structurale très nette traduisant un début de lyse.

Lorsque l'hyphe pénètre dans la cellule, elle refoule la paroi dont la résistance est diminuée par l'attaque enzymatique. Dans cette phase, une forte poussée mécanique s'excerce comme DEXHEIMER *et al.* (1979) et BOUDARGA (1989) l'ont suggéré d'après l'observation de certaines images montrant une déformation importante des structures cytoplasmiques.

La pénétration est aussi facilitée par certaines caractéristiques des hyphes intercellulaires. Nous avons observé que ces hyphes adhèrent fortement aux parois des cellules de l'hôte, parfois même par l'intermédiaire de protubérances crénelées ou de fibrilles polysaccharidiques qui semblent ancrer l'hyphe sur la paroi.

Il est certain qu'une solide fixation du champignon sur la paroi assure une meilleure efficacité lorsque a lieu la poussée de pénétration.

Enfin, la présence dans l'hyphe pénétrante de corps multivésiculaires au niveau de la paroi perforée semble liée à ce phénomène, même si la fonction précise de ces formations (excrétion d'enzymes?) ne nous apparaît pas clairement.

La perforation des parois des cellules-hôtes par l'endophyte ferait donc appel tout d'abord à une attaque enzymatique très localisée, modifiant la structure et la résistance de la paroi, puis à une poussée mécanique entraînant la rupture de la paroi affaiblie.

# \* <u>Le développement de l'arbuscule et les modifications</u> plasmalemmiques qu'il entraîne dans la cellule-hôte

L'arbuscule est édifié à partir de l'hyphe pénétrante qui se ramifie dichotomiquement un grand nombre de fois dans la cellule (KINDEN et BROWN 1975 a et c; CARLING et BROWN 1982; HARLEY et SMITH 1983; BONFANTE-FASOLO 1984; BONFANTE-FASOLO et FONTANA 1985).

Le cytoplasme de l'hôte est limité, au niveau des interfaces, par une membrane en continuité avec le plasmalemme périphérique. Comme d'autres auteurs, (DEXHEIMER *et al.* 1979; BONFANTE-FASOLO *et al.* 1981), en utilisant la coloration par l'acide phosphotungstique, nous avons montré qu'il s'agit d'une membrane de nature plasmalemmique.

Des travaux récents de GIANINAZZI-PEARSON et al. (1989) sur chimique du plasmalemme la composition périphérique et du l'interface, plasmalemme de ont montré des différences de constitution. Une fraction glycoprotéique, présente dans le plasmalemme périphérique, est absente du plasmalemme qui entoure champignon. Ces auteurs proposent le terme de "membrane le périsymbiotique" pour désigner le plasmalemme néoformé qui entoure les branches de l'arbuscule. L'utilisation d'un nom spécifique le plasmalemme de l'interface pour désigner est totalement justifié mais le terme "membrane périsymbionte" serait plus précis.

Le plasmalemme de l'hôte n'est jamais rompu et il entoure toutes les hyphes de l'arbuscule. Le champignon n'est donc pas réellement intracellulaire, mais reste confiné à l'espace périplasmique dont l'expansion a formé la matrice.

Nous signalerons toutefois que dans le cas d'une association incompatible, *Trifolium pratense L.* avec un champignon des endomycorhizes éricoïdes (*Pezizella ericae*), BONFANTE-FASOLO *et al.* (1984) ont observé la rupture du plasmalemme et la mort de la cellule infectée.

Compte tenu de la surface considérable développée par l'arbuscule, le plasmalemme de l'interface présente une surface plusieurs fois supérieure à celle du plasmalemme périphérique.

Pour COX et TINKER (1976), dans les mycorhizes d'oignon, cette surface est 2 fois plus importante que celle du plasmalemme périphérique et son périmètre 3,1 fois. Comme le suggèrent HARLEY et SMITH (1983), ces valeurs sont probablement supérieures pour d'autres endomycorhizes à vésicules et arbuscules. TOTH et MILLER (1984) calculent un rapport moyen de 0,13 entre la surface protoplasmique et le volume d'une cellule non infectée. Ce rapport atteint une valeur de 1,275 dans une cellule contenant un arbuscule mature. Le volume de la cellule étant resté le même, la surface plasmalemmique a augmenté de 10 fois.

Nous avons mesuré, dans une cellule corticale de merisier infecté par *Glomus intraradices*, un rapport de 6 entre le périmètre du plasmalemme de l'interface et celui du plasmalemme qui entoure la cellule.

Ces valeurs sont encore accrues par la formation de plasmalemmasomes (DEXHEIMER et al. 1982a, 1985b; KREUTZ-JEANMAIRE et al. 1988 b).

Comme nous l'avons précédemment signalé (KREUTZ-JEANMAIRE *et al.* 1988 b), la surface développée est telle qu'il faut admettre que la cellule-hôte a produit du nouveau plasmalemme au fur et à mesure du développement de l'arbuscule.

### \* L'interface, zone d'échange entre les deux partenaires

La matrice n'est pas un espace vide; divers auteurs y ont décrit des fibrilles polysaccharidiques et protéiques (DEXHEIMER *et al.* 1979; SCANNERINI et BONFANTE-FASOLO 1979) et parfois même un matériel dense et granulaire (CARLING *et al.* 1977).

Dans les mycorhizes de pommier et de merisier, grâce au test PATAg et à la coloration des protéines de SWIFT, nous avons pu confirmer la présence de fibrilles glycoprotéiques dans la matrice. Comme DEXHEIMER *et al.* (1979) l'ont déjà signalé, ces fibrilles sont soit libres, soit fixées sur la paroi du champignon ou sur le plasmalemme et les éléments des plasmalemmasomes de l'hôte. Nous avons aussi observé des tubules entre le plasmalemme de l'interface et la paroi du champignon.

Ces images évoquent celles interprétées par VIAN et ROLAND (1972), ROLAND (1973), ROLAND et PILET (1974) comme correspondant à la mise en place de matériel pariétal polymérisé au contact de synthétases du plasmalemme.

Dans le cas des mycorhizes à vésicules et arbuscules, les fibrilles glycoprotéiques présentes dans la matrice sont polymérisées sur la membrane périsymbionte. Elles forment un halo plus ou moins lâche autour des petites branches, mais une couche épaisse, bien individualisée, autour du tronc et des grosses branches (schéma 3 p.29). Cette formation pariétale est la couche d'isolement, signalée dans la plupart des mycorhizes à vésicules et arbuscules (BONFANTE-FASOLO et SCANNERINI 1977; DEXHEIMER et *al.* 1979, BONFANTE-FASOLO *et al.* 1981; KASPARI 1975; COX et SANDERS 1974; KINDEN et BROWN 1975 b, c, 1976; SCANNERINI et BONFANTE-FASOLO 1979; STRULLU 1976, 1978; KARIYA et TOTH 1981; GRIPPIOLO 1981; MARX 1981; PONS 1984; JACQUELINET-JEANMOUGIN 1986; KREUTZ-JEANMAIRE *et al.* 1988 a et b; BOUDARGA 1989) et qui est aussi bien représentée dans les mycorhizes des Rosacées ligneuses que nous avons étudiées.

La production de la couche d'isolement est habituellement interprétée (DEXHEIMER *et al.* 1985 a) comme traduisant une réaction de défense de la cellule-hôte contre l'invasion par le champignon. Des formations comparables ont aussi été signalées au cours d'attaques parasitaires (EHRLICH *et al.* 1971; LITTLEFIELD et BRACKER 1972).

Les échanges entre les deux partenaires se font donc par la voie apoplastique (HARLEY et SMITH 1983) et non par la voie symplastique.

STRULLU (1982, 1986) signale que cette structure apoplasmique est constante dans tous les types de mycorhizes. Pour cet auteur, les interfaces des endomycorhizes et des ectomycorhizes sont comparables: elles comprennent deux membranes plasmiques, deux espaces clairs, séparés par une double structure de type pariétal. Chez les ectomycorhizes, la zone d'apposition intègre la paroi de l'hyphe du réseau de Hartig et la paroi de la cellule racinaire. Chez les endomycorhizes, elle intègre la paroi de l'endophyte et la couche d'isolement (STRULLU 1982). Sans nier les conclusions de cet auteur, nous ferons toutefois remarquer que la couche d'isolement présente rarement une structure aussi dense et aussi organisée qu'une paroi de cellule-hôte. Si topologiquement, la théorie unitaire de l'organisation des interfaces semble valable, les modalités des échanges entre les deux partenaires sont probablement différentes dans les endomycorhizes et dans les ectomycorhizes. De plus, les hyphes du réseau de Hartig sont souvent enrobées d'un ciment dense, qui n'existe pas dans l'interface des endomycorhizes.

#### \* <u>L'envahissement d'une cellule corticale de l'hôte par</u> <u>l'endophyte induit de profondes modifications de son organisation</u> <u>ultrastructurale</u>

La régression de l'appareil vacuolaire et l'accroissement du volume cytoplasmique ont déjà été signalés par divers auteurs (COX et TINKER 1976; CARLING et BROWN 1982; BONFANTE-FASOLO 1984; TOTH et MILLER 1984; BONFANTE-FASOLO et FONTANA 1985: KREUTZ-JEANMAIRE et al. 1988 a; BOUDARGA 1989). Ce phénomène est très net dans le matériel que nous avons étudié. Dans les cellules non infectées, l'essentiel du volume est occupé par une énorme vacuole et le cytoplasme est réduit à un mince film pariétal. Au contraire, dans les cellules abritant un arbuscule vivant, l'appareil vacuolaire est fragmenté en éléments de petite taille, isolés au sein d'un cytoplasme très dense et très abondant.

L'accroissement du volume cytoplasmique est important puisqu'il est évalué à 23 fois celui d'une cellule sans champignon (COX et TINKER 1976).

Ces phénomènes semblent être une caractéristique constante de ce type de mycorhize mais non de toutes les endomycorhizes, puisque DEXHEIMER *et al.* (1985 b) ne les ont pas observés dans les endomycorhizes de *Terfezia claveryi*.

Pendant la phase de développement de l'arbuscule dans la cellule, cette dernière produit du matériel plasmalemmique et cytoplasmique en grande quantité. Compte tenu de la courte longévité des arbuscules, évaluée de 4 à 15 jours (HARLEY et SMITH 1983), la phase initiale d'établissement est relativement rapide, probablement quelques dizaines d'heures, pendant lesquelles la cellule doit très rapidement produire du matériel plasmalemmique et cytoplasmique. Nul doute qu'une grande partie de son métabolisme est alors mobilisée dans ce but. La cellule se comporte alors en puits, attirant vers elle les matériaux nécessaires aux multiples synthèses.

En plus de ces modifications de l'organisation générale de la cellule, divers organites et structures sont aussi modifiés.

Comme l'ont déjà observé divers auteurs (KINDEN et BROWN 1975

b; STRULLU 1978, 1982; CARLING et BROWN 1982; BONFANTE-FASOLO 1984; JACQUELINET-JEANMOUGIN 1986), le nombre des mitochondries s'accroît sensiblement. Elles forment souvent des groupements à proximité des branches de l'arbuscule. Leur abondance et le développement de leurs crêtes indiquent une intense activité, liée certainement à la fourniture d'énergie pour assurer les synthèses cellulaires et les échanges entre les partenaires.

Le réticulum endoplasmique se développe considérablement, et ses grandes travées sont parfois très abondantes à proximité des branches de l'arbuscule. Les membranes réticulaires sont bordées de polysomes qui sont également nombreux dans le hyaloplasme. Tout ceci indique une intense activité de transfert et de synthèses protéigues.

Nous avons signalé (KREUTZ-JEANMAIRE *et al.* 1988 a et b, DEXHEIMER *et al.* 1986) l'existence de nombreux contacts entre les travées réticulaires et le plasmalemme qui borde l'interface.

Des contacts entre le plasmalemme et le réticulum endoplasmique sont connus dans des cellules produisant de grandes quantités de matériel pariétal (ROLAND 1973; PARGNEY 1986). Ils sont interprétés comme correspondant au transfert à proximité du plasmalemme de précurseurs polysaccharidiques solubles.

Dans le cas des mycorhizes à vésicules et arbuscules, nous rappelons que des images de polymérisation de fibrilles polysaccharidiques sur le plasmalemme de l'interface ont déjà été observées ainsi que la mise en place d'une couche d'isolement.

Nous avons également mis en évidence dans les travées du réticulum endoplasmique, au niveau de la zone de contact avec le plasmalemme, des composés amorphes de nature polysaccharidique.

D'autre part, les dictyosomes, habituellement responsables d'une grande partie des synthèses de polysaccharides, sont peu abondants. Seuls quelques auteurs (SCANNERINI et BONFANTE-FASOLO 1976) ont signalé de nombreux dictyosomes actifs dans les cellules-hôtes. Dans la majorité des mycorhizes V.A. observées, les dictyosomes sont peu abondants et ne peuvent donc rendre compte de la production des composés de la couche d'isolement.

Les contacts entre le réticulum endoplasmique et le plasmalemme correspondraient au transfert dans la matrice des précurseurs polysaccharidiques de la couche d'isolement. Le rôle des dictyosomes serait réduit et de ce fait, il y aurait, pour les synthèses polysacchariques, court-circuit de la phase golgienne.

Une autre particularité des cellules infectées par un endophyte formant des mycorhizes V.A. est la présence de plastes particuliers qui présentent un système interne de tubules et des organites osmiophiles (les plastoglobules).

SCANNERINI et BONFANTE-FASOLO (1977) décrivent dans les cellules d'une mycorhize d'*Ornithogalum umbellatum* des chromoplastes contenant du carotène et donnant une couleur jaunâtre aux portions racinaires infectées.

Dans les cellules d'autres mycorhizes (Liriodendron tulipifera, KINDEN et BROWN 1975 c; Taxus baccata, STRULLU 1978; *Vitis*, BONFANTE-FASOLO 1978), les auteurs ont observé soit des plastes dont l'évolution est bloquée au stade proplaste (KINDEN et BROWN 1975 c; STRULLU 1978) soit des petits plastes renfermant de l'amidon (BONFANTE-FASOLO 1978).

Dans les mycorhizes de pommier et de merisier, nous avons également noté des modifications plastidiales remarquables. Dans les cellules corticales non infectées, les plastes sont de gros amyloplastes. Dans les cellules qui renferment un arbuscule vivant, les plastes très allongés ne renferment plus d'amidon. Bien que les portions racinaires infectées soient colorées en jaune, en l'absence d'études biochimiques précises, nous interprétons ces plastes comme des leucoplastes dont la matrice contient un système de tubules très développé et des amas de substances osmiophiles. Lorsque l'arbuscule est mort, nous observons à nouveau de l'amidon dans les plastes.

L'absence d'amidon dans les plastes semble liée chez le pommier et le merisier à la présence de structures arbusculaires actives.

D'autres auteurs ont également signalé l'absence d'amidon dans les cellules infectées. SCANNERINI et BONFANTE-FASOLO (1983) interprètent ce phénomène comme l'indication d'une modification du métabolisme des sucres de la plante-hôte en relation avec le transport des sucres vers l'endophyte.

L'évolution des leucoplastes en amyloplastes lorsque l'arbuscule meurt, semble confirmer cette hypothèse concernant la perturbation du métabolisme glucidique. En fait, l'appel de sucres vers l'endophyte est tellement important qu'ils ne peuvent pas s'accumuler dans les plastes sous forme d'amidon, tant que l'arbuscule est actif.

Mais cette interprétation ne peut pas expliquer à elle seule toutes les transformations plastidiales; en particulier dans des espèces comme *Plectranthus australis* (DEXHEIMER *et al.* 1990) et *Ornithogalum umbellatum* (SCANNERINI et BONFANTE-FASOLO 1977), où l'évolution des plastes dans les racines non infectées donne naissance à des leucoplastes sans amidon. Dans ce cas, l'absence d'amidon est caractéristique des cellules sans champignon et ne peut donc être mise en relation avec une altération du métabolisme glucidique.

Si la différenciation plastidiale résultait de la disparition de l'amidon, ce phénomène devrait produire soit des plastes bloqués au stade proplaste, comme l'ont observé KINDEN et BROWN (1975 b et c) et STRULLU (1978), soit des leucoplastes de structure extrêmement simple. Il ne pourrait donc pas y avoir différenciation en chromoplastes (SCANNERINI et BONFANTE-FASOLO 1977) ou en leucoplastes de structure très complexe, comme nous l'avons observé dans les mycorhizes de merisier et de pommier. Le processus de l'évolution plastidiale est donc certainement plus complexe qu'une simple modification du métabolisme glucidique.

L'organisation des leucoplastes des mycorhizes de merisier ou de pommier avec un réseau de microtubules à contenu plus ou moins dense, rappelle celle décrite par CHENICLET et CARDE (1988) dans les poils sécréteurs des feuilles de *Stachys lanata*. Ces poils synthétisent des composés volatils, essentiellement des terpènes, et les plastes jouent un rôle majeure dans la synthèse de ces substances (GLEIZES *et al.* 1983; CAMARA 1984; CHENICLET et CARDE 1985; DUDLEY *et al.* 1986).

Certains terpènes ont une action fongicide (SITTON et WEST 1975; DUDLEY *et al.* 1986) et sont des phytoalexines. Ces terpènes sont produits dans le cas d'attaques parasitaires.

C'est ainsi que DUDLEY et al. (1986) signalent la présence d'une importante quantité de phytoalexines chez *Ricinus communis* attaqué par un parasite fongique.

Dans les mycorhizes V.A., la pénétration d'une hyphe intercellulaire et la formation d'un arbuscule présentent des analogies avec une attaque parasitaire. La cellule-hôte réagit en produisant du matériel polysaccharidique afin d'encapsuler le champignon et de bloquer sa progression.

MORANDI (1984, MORANDI et al. 1987) a mis en évidence une phytoalexine, la glycéoline, chez des légumineuses infectées par un champignon endomycorhizien.

L'ensemble de ces faits (analogie de l'infection mycorhizienne avec une attaque parasitaire, dans certains cas production de phytoalexines par les cellules de l'hôte, implication des plastes dans la production des terpènes) nous conduit à interpréter les plastes des cellules infectées par l'endophyte comme des leucoplastes sécréteurs impliqués dans la production de terpènes antifongiques dirigés contre l'endophyte.

Au cours des interactions plantes-parasites, des molécules appelées éliciteurs et provenant de l'un ou l'autre partenaire interviennent comme signaux pour déclencher chez le végétal des mécanismes actifs de défense (BRUNETEAU et RICCI 1988).

Chez *Ricinus communis*, la production de phytoalexines est élicitée sous l'action de fragments pectiques de la paroi cellulaire, libérés par une enzyme fongique, l'endopolygalacturonase (BRUCE et WEST 1982).

Dans les mycorhizes V.A., ces éliciteurs pourraient correspondre aux fibrilles polysaccharidiques présentes dans la matrice, élaborées par la cellule-hôte, et dont la polymérisation est bloquée par l'endophyte.

Dans les mycorhizes que nous avons étudiées, la différenciation des plastes en leucoplastes sécréteurs serait donc l'expression d'une réaction de défense de la cellule vis-à-vis du symbiote fongique.

# \* Dégénérescence et mort de l'arbuscule

La durée de vie d'un arbuscule dans une cellule est fort limitée, puisque après 4 à 15 jours, suivant l'hôte et l'endophyte considérés (BEVEGE et BOWEN 1975; COX et TINKER 1976), l'arbuscule meurt.

Le cytoplasme de l'endophyte dégénère et disparaît. L'arbuscule est alors réduit à une masse dense de parois fongiques effondrées réunies dans une matrice commune et entourée par le plasmalemme de l'hôte. L'effondrement semble commencer par l'extrémité des petites branches (TOTH et MILLER 1984) pour s'étendre ensuite aux grosses branches puis au tronc de l'arbuscule. La persistance dans la cellule des restes fongiques indique que la lyse n'est pas totale comme dans les mycorhizes d'Orchidées (HADLEY *et al.* 1971; STRULLU et GOURRET 1974; HADLEY 1975; SCANNERINI *et al.* 1975; SERRIGNY 1985).

L'organisation de la cellule-hôte montre aussi des remaniements remarquables. L'appareil vacuolaire se développe considérablement pour ne plus former qu'une seule vacuole qui occupe l'essentiel du volume cellulaire. Le cytoplasme régresse et n'est plus représenté que par un mince film appliqué sur les parois et autour des restes fongiques. De plus, certains auteurs (TOTH et MILLER, 1984) signalent la présence de corps osmiophiles dans les cellules abritant un arbuscule mort.

Les organites de la cellule-hôte se raréfient, et dans notre matériel, les leucoplastes sécréteurs se transforment en amyloplastes.

En fait, une cellule qui contient un arbuscule mort présente une organisation très proche de celle d'une cellule non infectée, puisque l'essentiel du volume est occupé par une grosse vacuole et que les plastes sont des amyloplastes. Les modifications induites lors de l'invasion sont donc parfaitement réversibles.

La comparaison avec l'organisation d'une cellule contenant un arbuscule vivant met en évidence un point intéressant. Les variations importantes du volume cytoplasmique, et en particulier sa régression dans les cellules contenant un arbuscule mort, font apparaître une mobilisation de matériel cytoplasmique.

Pendant la phase d'édification de l'arbuscule, la cellule accroît son volume cytoplasmique, attire vers elle les matériaux nécessaires; elle se comporte donc en puits.

Au contraire, pendant la phase de dégénérescence de l'arbuscule, le cytoplasme régresse et la cellule libère les matériaux résultant de la destruction du cytoplasme. Elle se comporte en source. Mais nous ne savons pas quel est le devenir matériaux libérés. Peut-être sont-ils utilisés par des des cellules en phase d'édification? ou sont-ils détournés par A l'appui de cette deuxième hypothèse, nous l'endophyte? rappellerons que dans les parties âgées des mycorhizes, le réseau d'hyphes intercellulaires se développe beaucoup. Ceci est matériaux peut-être en relation avec l'utilisation des cytoplasmiques mobilisés lors de la régression du cytoplasme des cellules-hôtes. Cela supposerait donc, dans la phase finale d'évolution de la mycorhize, un changement profond des rapports entre les deux partenaires, puisque les transferts s'effectuant entre des cellules et des hyphes intercellulaires seraient du type ectomycorhizien.

### \* <u>Dans les cellules corticales externes, les formations</u> <u>intraracinaires sont des pelotons.</u>

Ces formations décrites dans certaines mycorhizes à vésicules et arbuscules (Liriodendron: KINDEN et BROWN 1975 a et b; Gentiana JACQUELINET-JEANMOUGIN GIANINAZZI -PEARSON lutea: et 1983: JACQUELINET-JEANMOUGIN, 1986; Ginkgo biloba: BONFANTE-FASOLO et FONTANA 1985; Eucalyptus: MALAJCZUK et al. 1981; BOUDARGA et DEXHEIMER 1988; Erable: MARX 1981; SMITH et GIANINAZZI-PEARSON 1988; Pirus malus et Prunus avium: KREUTZ-JEANMAIRE et al. 1988 a; YAWNEY et SCHULTZ 1990) semblent Acer saccharum: plus particulièrement présentes dans les mycorhizes d'essences ligneuses.

L'hyphe pénétrante s'enroule dans la cellule sans s'y diviser; toutes les sections fongiques d'un peloton sont de taille identique.

Comme lors de la formation d'un arbuscule, le plasmalemme de l'hôte n'est jamais rompu. Par contre, la présence d'un peloton n'induit pas de transformations remarquables dans l'organisation de la cellule-hôte. Le cytoplasme reste sous forme d'un mince film pariétal qui vient entourer les sections du champignon; de même il n'y a pas de transformations plastidiales.

Les échanges au niveau des pelotons semblent peu importants. A l'appui de cette hypothèse, SMITH et GIANINAZZI-PEARSON (1988) n'observent pas sur le plasmalemme qui borde l'interface au niveau des pelotons, l'activité ATPasique décrite au niveau du plasmalemme qui borde l'arbuscule.

Nous avons également rencontré des pelotons dans des cellules abritant un arbuscule mort, ce qui suggère un essai de réinfection de la cellule-hôte. L'hyphe pénétrante s'enroule dans la cellule sans pouvoir y développer un nouvel arbuscule.

Chez le pommier, nous avons observé des hyphes intercellulaires utilisant d'anciennes hyphes vides comme conduit pour réinfecter une portion racinaire. Ce phénomène a déjà été signalé par LIM *et al.* (1984) pour l'association *Trifolium repens/Glomus fasciculatum*, et par GIANINAZZI-PEARSON *et al.* (1981) pour *Rubus ideus/Glomus tenuis*. Il n'a qu'une influence limitée sur le déroulement de l'infection.

# **PHOTOGRAPHIQUES**

×

# N° 1 à 10

# 48

Mycorhizes de pommier (fig: 1) et de merisier (figs: 2 à 4) Observations au microscope photonique. Coloration par le bleu trypan (figs: 1, 2) Coloration par le bleu de toluidine (figs: 3, 4).

<u>Figure 1 :</u> L'endophyte apparaît coloré en bleu. Portion d'une racine courte fortement infectée. (X 160)

<u>Figure 2:</u> Les hyphes externes pénètrent dans la racine. La coloration met en évidence les vésicules caractéristiques des mycorhizes de type vésiculo-arbusculaire. (X 160)

Figure 3: Coupe semi-mince d'une mycorhize de merisier/Glomus intraradices. Zone corticale externe de la racine, avec des hyphes intercellulaires et un peloton. (X 1600)

Figure 4: Coupe semi-mince d'une mycorhize de merisier/Glomus intraradices. Zone corticale interne de la racine, avec des hyphes intercellulaires, des arbuscules vivants et morts. Les arbuscules vivants sont localisés dans la couche cellulaire en contact avec l'endoderme. (X 1600)



Ultrastructure des mycorhizes de merisier/Glomus intraradices (figs: 1, 2) et de merisier/Glomus mosseae (fig: 3) obtenues en conditions contrôlées.

Les hyphes intercellulaires.

.

Figure 1: Test PATAg. Les hyphes intercellulaires progressent au niveau des méats, ou directement entre les cellules corticales dont elles écartent les parois primaires. (X 8000)

Figure 2: Acétate d'uranyle - Citrate de plomb. Les hyphes intercellulaires ne sont pas libres dans les méats mais elles s'accolent aux parois cellulaires de l'hôte. (X 6500)

Figure 3: Acétate d'uranyle - Citrate de plomb. L'hyphe intercellulaire renferme une multitude de petites vacuoles rondes caractéristiques des Endogonacées. Ces vacuoles montrent parfois un granule de polyphosphate. (X 14000)



Ultrastructure des mycorhizes de pommier/Glomus intraradices (figs: 1,2,3,5 et 6) et de merisier/Glomus intraradices (fig: 4) obtenues en conditions controlées. Hyphes intercellulaires.

Figure 1: Test PATAg. L'hyphe intercellulaire émet des ramifications latérales qui pénètrent dans les cellules corticales. Dans l'association pommier/Glomus intraradices, le méat est rempli d'une substance dense dans laquelle sont incluses des fibrilles polysaccharidiques réactives. (X 7000)
Figure 2: Réaction de SWIFT. Les fibrilles incluses dans la substance dense sont marquées par la réaction de SWIFT. (X 8000)

Figure 3: Réaction de SWIFT. La surface de l'hyphe intercellulaire est crénelée. Elle émet des protubérances qui se fixent sur la paroi de la cellule-hôte, assurant ainsi un ancrage de l'hyphe sur la paroi cellulaire. (X 21000)

Figure 4: Réaction de SWIFT. L'hyphe intercellulaire s'accole étroitement à la paroi de la cellule-hôte. (X 14000)

Figures 5 et 6:

Test PATAg.

Zones infectées âgées: les cellules corticales renferment des arbuscules morts.

Les hyphes intercellulaires sont abondantes et peuvent occuper la totalité de la lumière du méat.

Les plastes des cellules corticales non infectées sont des amyloplastes.

(X 2500) (X 6500)



Ultrastructure des mycorhizes de pommier/Glomus (fig: 3) et de merisier/Glomus intraradices (fig: intraradices 1,2,4,5 et 6) obtenues en conditions contrôlées.

l'arbuscule et Etablissement de variations l'organisation de la cellule-hôte en fonction de l'évolution de l'arbuscule.

#### Figure 1:

Test PATAg.

Le processus de pénétration débute par l'accolement de l'hyphe intercellulaire contre la paroi cellulaire. La structure pariétale de la cellule corticale paraît se désagréger au niveau de la zone de contact.

(X 6000)

#### Figure 2:

Test PATAg.

L'hyphe pousse sur la paroi cellulaire désorganisée et pénètre dans la cellule-hôte. Dans le cytoplasme fongique, le noyau est en position apicale. Deux corps multivésiculaires sont visibles de part et d'autre de la perforation.

(X 9000)

#### Figure 3:

Test PATAg.

Stade initial de la colonisation de la cellule.

L'hyphe pénétrante a donné un tronc massif et quelques fines branches. La vacuole occupe la quasi-totalité du volume cellulaire. Le cytoplasme est réduit à une mince pellicule en position pariétale ou localisée autour des quelques hyphes de l'arbuscule.

(X 3500)

#### Figure 4:

Acétate d'uranyle - Citrate de pomb.

La cellule renferme un arbuscule bien développé. Les sections fongiques sont de diamètres variés (grosses et petites branches). Le cytoplasme de l'hôte est très important; le système vacuolaire est réduit à quelques petits éléments. (X 5500)

Figure 5: Acétate d'uranyle - Citrate de plomb. Arbuscule dégénérescent. Les branches de l'arbuscule sont vidées de leur contenu cytoplasmique et sont effondrées. Le tronc est encore vivant. Le cytoplasme de l'hôte régresse nettement. (X 4000)

Figure 6: Acétate d'uranyle - Citrate de plomb. Stade final. L'arbuscule est mort.

Les branches sont effondrées et agglomérées en masses denses. Le cytoplasme est réduit à une mince pellicule le long des parois et autour des restes fongiques. (X 3000)



Ultrastructure des mycorhizes de pommier/Glomus intraradices (fig: 2) et de merisier/Glomus intraradices (figs: 1,3,4 et 5) obtenues en conditions contrôlées.

Figure 1:

Acétate d'uranyle - Citrate de plomb.

Au sein de la masse d'hyphes mortes, apparaissent des éléments membranaires présentant une structure tripartite. Ils se présentent sous forme de vésicules ou de tubules dérivant probablement de formations plasmalemmiques de l'hôte.

Le réticulum endoplasmique est constitué de longues travées et montre des contacts avec le plasmalemme qui borde l'arbuscule effondré.

(X 38000)

Figure 2: Test PATAg. Les restes fongiques sont encapsulés dans un matériel fibrillaire réactif au test PATAg, ils forment des masses denses dans la cellule. (X 6000)

Figure 3: Acétate d'uranyle - Citrate de plomb. Des fibrilles sont visibles au niveau de l'interface: elles peuvent être fixées sur le plasmalemme de l'hôte, libres dans la matrice ou au contact de la paroi fongique. (X 23000)

Figure 4: Acétate d'uranyle - Citrate de plomb. Détail d'un arbuscule vivant. Les hyphes sont jeunes avec un cytoplasme riche en organites. L'interface comprend: le plasmalemme de l'hôte, la matrice, le plasmalemme et la paroi fongique. La surface plasmalemmique est accrue par la présence d'un empilement concentrique de membranes. (X 27000)

Figure 5: Test PATAg. Le plasmalemme de l'hôte et les formations plasmalemmiques sont bien marqués par le test PATAg. (X 46000)



Ultrastructure des mycorhizes de merisier/Glomus intraradices (figs: 1 à 3) et de pommier/Glomus intraradices (figs: 4 à 6) obtenues en conditions contrôlées.

Figure 1: Test PATAg. Les fibrilles présentes dans la matrice sont réactives au test de mise en évidence des polysaccharides. (X 52000) Figure 2: Test PATAg. Au niveau des grosses branches, le matériel fibrillaire s'organise en une couche d'isolement continue et réactive au test PATAg (flèche). (X 15000) Figures 3 et 4: Test PATAg. Les formations plasmalemmiques du champignon sont réactives au test PATAg. (X 25000) (X 29500) Figure 5: Test PATAg. Comparaison entre l'interface d'une grosse branche et d'une petite branche. Dans les deux cas, l'interface est limitée du côté du cytoplasme de la cellule-hôte par le plasmalemme bien marqué par la réaction. Le long de la grosse branche, la couche d'isolement est parfois dense et épaisse. (X 20000) Figure 6: Réaction de SWIFT. La réaction de SWIFT met en évidence la nature protéique des fibrilles localisées dans la matrice autour des branches de l'arbuscule.

(X 21000)


Ultrastructure des mycorhizes de merisier/Glomus intraradices (figs: 1,2,3,4 et 6) et de pommier/Glomus intraradices (fig: 5) obtenues en conditions contrôlées.

Figure 1: Acide phosphotungstique. Sur toute la surface développée autour de l'arbuscule, la membrane plasmalemmique présente une nette affinité pour l'acide phosphotungstique. (X 25000) Figure 2: Acétate d'uranyle - Citrate de plomb. De fins tubules relient le plasmalemme à la paroi fongique. (X 81000) Figures 3 et 4: Acétate d'uranyle - Citrate de plomb. Le volume cytoplasmique de l'hôte s'accroit Le considérablement. Le cytoplasme est riche en organites. Les dictyosomes sont formés par l'empilement de 5 à 6 saccules. Les polyribosomes sont abondants. Le réticulum endoplasmique est présent soit sous forme de longues travées, soit sous forme d'un réseau de tubules. (X 25000) (X 24500) Figures 5 et 6: Test PATAg.

Les plastes des cellules corticales infectées sont des leucoplastes sécréteurs.

Leur stroma contient des plastoglobules et un réseau de fins tubules dont certains éléments sont marqués par le test PATAg.

(X 15500) (X 26500)



Ultrastructure des mycorhizes de merisier/Glomus intraradices (figs: 1,3,4 et 5) et de pommier/Glomus intraradices (fig: 2) obtenues en conditions contrôlées.

Figure 1: Test PATAg. Les petites branches de l'arbuscule ont un diamètre à peine supérieur à celui du leucoplaste. Le test PATAg permet de distinguer nettement deux types de tubules dans le stroma plastidial. Il y a connexion entre ces deux types de tubules. Les mitochondries sont abondantes et montrent un système de crêtes bien développé. (X 24500)

Figure 2: Test PATAg. Les leucoplastes évoluent en amyloplastes lorsque l'arbuscule meurt. (X 2500)

Figure 3: Acétate d'uranyle - Citrate de plomb. Le réticulum endoplasmique présente des contacts avec le plasmalemme de l'hôte au niveau de l'interface. (X 22500)

<u>Figure 4:</u> Acétate d'uranyle - Citrate de plomb. Détail de la figure précédente. Dans la matrice on observe la présence de microtubules. (X 73000)

Figure 5: Test PATAg. Les travées réticulaires qui sont en contact avec le plasmalemme de l'hôte, sont légèrement renflées et dépourvues de ribosomes. (X 46000)



Ultrastructure des mycorhizes de merisier/Glomus intraradices (figs: 1 à 3) et de pommier/Glomus intraradices (figs: 4 à 6) obtenues en conditions contrôlées.

Figure 1:

Acétate d'uranyle - Citrate de plomb.

Coupe tangentielle du plasmalemme de l'interface montrant les nombreux tubules du réticulum endoplasmique en contact avec le plasmalemme.

(X 70000)

#### Figure 2:

Test PATAg.

La lumière des travées réticulaires contient des composés amorphes marqués, qui réagissent au test des polysaccharides. Le contenu de ces travées semble passer dans la matrice. (X 71000)

X 71000.

Figure 3:

Acétate d'uranyle - Citrate de plomb.

Le noyau de la cellule-hôte est volumineux. La chromatine est répartie en amas dans un nucléoplasme finement granuleux. (X 26000)

### Figure 4:

Test PATAg.

Le noyau de la cellule-hôte présente parfois un aspect lobé et peut venir entourer les branches de l'arbuscule. (X 5000)

#### Figures 5 et 6:

Test PATAg.

Dans les racines de pommier, l'infection des cellules est particulièrement importante dans la couche directement en contact avec l'endoderme.

Une hyphe arbusculaire tente de pénétrer dans le méat entre deux cellules de l'endoderme. L'hôte réagit en produisant du matériel polysaccharidique marqué par le test PATAg, pour bloquer la progression du champignon. On observe la présence d'un corps multivésiculaire dans le cytoplasme fongique au niveau de la pénétration.

(X 13000) (x 11500)



Ultrastructure des mycorhizes de pommier/Glomus intraradices obtenues en conditions contrôlées.

Figure 1:

Acétate d'uranyle - Citrate de plomb. Cellule renfermant un peloton. Les hyphes ont un diamètre important. Le peloton résulte

d'un enroulement d'une hyphe dans la cellule. (X 10000)

Figure 2: Test PATAg. Cellule renfermant un peloton. La paroi fongique est doublée par une couche réactive au test de mise en évidence des polysaccharides. Les plastes renferment de gros grains d'amidon. (X 14500)

Figure 3: Réaction de SWIFT. Formation d'un peloton dans une cellule renfermant un arbuscule mort. Les hyphes intercellulaires présentent une double paroi (flèche) témoin de deux vagues d'infection dans cette portion racinaire. (X 3000)

Figures 4 et 5: Test PATAg. Zones infectées agées. De jeunes hyphes intercellulaires utilisent d'anciennes hyphes vides comme conduit pour recoloniser une portion racinaire. Les hyphes intercellulaires apparaissent alors avec plusieurs structures pariétales concentriques. (X 8000) (X 6500)



# CHAPITRE II

# ETUDE ULTRASTRUCTURALE DES MYCORHIZES A VESICULES ET ARBUSCULES DE MERISIERS PRELEVES EN CONDITIONS NATURELLES

# ETUDE ULTRASTRUCTURALE DES MYCORHIZES A VESICULES ET ARBUSCULES DE MERISIERS PRELEVES EN CONDITIONS NATURELLES.

#### 1. INTRODUCTION.

S'il est tout à fait possible d'obtenir, en conditions contrôlées, des mycorhizes à vésicules et arbuscules avec des merisiers, il en est peut-être autrement dans la nature. L'observation de merisiers développés et mycorhizés en milieu naturel apparaît donc nécessaire, pour vérifier les résultats obtenus dans le premier chapitre. Comme les germinations de merisiers sont relativement rares dans les conditions naturelles, nous avons utilisé des rejets de quelques dizaines de centimètres de haut, se développant autour d'un arbre mère.

La première étape de ces travaux consiste à définir l'état mycorhizien de ces plants prélevés dans la nature.

Dans des conditions parfaitement contrôlées, il est possible d'associer de jeunes plants de merisier avec les champignons des endomycorhizes à vésicules et arbuscules (PONS 1984). Par contre, dans les conditions naturelles, compte tenu de la concurrence entre les divers micro-organismes telluriques et notamment les champignons mycorhiziens, les associations mycorhiziennes peuvent être différentes. Nous rappellerons d'ailleurs que le genre *Prunus* et diverses autres Rosacées ligneuses sont citées par HARLEY et SMITH (1983) comme étant ectomycorhizés. Mais STRULLU (1982) signale la présence d'ectomycorhizes et d'endomycorhizes pour les genres *Malus* et *Prunus*.

La seconde étape de cette étude concerne un suivi des mycorhizes au cours des saisons.

Peu de travaux en font état, car la plupart des études sur les mycorhizes sont effectuées après un temps déterminé de culture (en général quelques semaines) en conditions contrôlées. Il paraissait donc tout à fait intéressant de suivre, en conditions naturelles, l'évolution de la mycorhization des merisiers sur une année de végétation.

Les plantes mycorhizées, élevées en serre ou au laboratoire dans des chambres climatiques, sont en conditions contrôlées: l'arrosage, la température et l'éclairement sont réguliers. Dans ce système, la mycorhize, une fois installée, n'est pas perturbée par la modification de facteurs externes. Dans la nature il en est tout autrement et divers facteurs externes (température, photopériode, humidité, microflore tellurique) rendent le système beaucoup plus complexe. Ils vont conditionner le développement et le fonctionnement de la plante: vie latente en hiver, croissance au printemps ou en été, accumulation de réserves en automne, associations symbiotiques ou parasitaires. Les mycorhizes, parties intégrantes du système racinaire, sont donc elles aussi soumises à l'influence de ces facteurs biotiques ou abiotiques.

#### 2. CONDITIONS DE RECOLTE.

#### 2.1. DESCRIPTION DES STATIONS.

Pour cette étude, nous avons choisi deux stations avec des sols très différents, l'une située sur le plateau de Sexey-aux-Forges, l'autre sur le plateau de Brabois, en contrebas du manège du centre d'équitation. Elles sont toutes deux orientées Nord/Nord-Est.

La station de Sexey-aux-Forges correspond à d'anciennes cultures en terrasses, abandonnées et envahies par une végétation herbacée et buissonnante, avec quelques grands arbres, dont le merisier auprès duquel nous avons prélevé les rejets. Le sol est formé de terre brune, mélangée à des fragments de roche calcaire.

La station de Brabois est recouverte d'un peuplement arborescent en relation avec le parc de Brabois. Par suite du ruissellement des eaux, une partie du sable du manège est entrainée. Le sol, sur une épaisseur d'au moins 50 centimètres, est meuble et sableux. Du fait de la présence des chevaux, les apports d'azote sont très importants. Les mycorhizes ont été prélevées uniquement dans la couche sableuse.

#### 2.2. DESCRIPTION DES PRELEVEMENTS.

La nature des mycorhizes colonisant les deux systèmes racinaires a été contrôlée sur des échantillons provenant des deux stations.

Les prélévements ont été effectués en avril pour la station de Sexey-aux-Forges, et en octobre sur des rejets dont les feuilles étaient encore bien vertes, pour la station de Brabois. Nous avons observé à ces dates des mycorhizes bien installées, permettant pour chaque station une étude ultrastructurale détaillée de l'association.

Compte tenu de l'abondance des rejets de merisier, nous avons choisi la station de Sexey-aux-Forges pour étudier l'évolution de la mycorhization au fil des saisons.

### 2.3. DESCRIPTION DES OBJETS RETENUS.

Le système racinaire des merisiers est rincé à l'eau du robinet pour le débarrasser des particules terreuses.

Il est constitué d'éléments bruns, subérifiés et coriaces, et de quelques jeunes racines claires et tendres. Quelle que soit l'époque de nos prélèvements, nous avons toujours retrouvé la présence de ces jeunes racines aux côtés des racines subérifiées. Le système racinaire est rapidement trié sous la loupe binoculaire, et seules les jeunes racines sont prélevées en recherchant de préférence celles de teinte jaunâtre avec la présence de quelques filaments mycéliens adhérents.

### 3. RESULTATS,

Nous présenterons successivement: les résultats de l'étude cytologique (microscopie photonique et électronique) des mycorhizes prélevées dans les stations, puis ceux concernant le suivi de l'évolution de la mycorhization au cours de l'année.

#### 3.1. ETUDE EN MICROSCOPIE PHOTONIQUE

Pour une première approche, nous avons utilisé des fragments de racine colorés par le bleu trypan, puis pour des observations plus précises, des coupes semi-fines d'objets préparés pour la microscopie électronique.

La plupart des fragments de racine renferment des filaments mycéliens (Planche 11, fig. 1) fortement colorés par le bleu Trypan. Nous observons la présence de vésicules (Planche 11, fig. 3), d'arbuscules (Planche 11, figs. 1 et 2) et de boucles mycéliennes (Planche 11, fig. 4).

Les coupes semi-fines colorées par le bleu de toluidine permettent de mettre en évidence la répartition du champignon dans la racine.

Dans la partie externe du cortex racinaire, l'endophyte est essentiellement présent sous forme d'hyphes intercellulaires de gros diamètre (Planche 12, figs. 1 et 2) et de pelotons mycéliens (Planche 12, fig. 3). Les cellules proches du cylindre central contiennent des sections d'hyphes, de diamètres variés, correspondant aux arbuscules. Ces derniers peuvent être abondants et occuper la quasi totalité des cellules qui entourent le cylindre central (Planche 12, fig. 4).

Les sections d'hyphes intercellulaires sont souvent disposées en file (Planche 12, figs. 1 et 2), indiquant une densité importante du réseau intercellulaire.

Ces premières observations nous permettent de conclure à l'existence d'endomycorhize de type vésiculo-arbusculaire. Nous n'avons jamais observé, au cours de nos études, la présence d'un autre type de mycorhize.

En microscopie photonique, les mycorhizes V.A. récoltées sur les deux stations sont identiques.

#### 3.2. ETUDE EN MICROSCOPIE ELECTRONIQUE.

# <u>3.2.1. Les mycorhizes prélevées sur la station de Sexey-aux-Forges.</u>

#### 3.2.1.1. Les hyphes intercellulaires.

Comme les observations en microscopie photonique l'ont déjà montré, le réseau d'hyphes intercellulaires est bien développé. Les hyphes sont soit groupées dans les méats dont elles occupent toute la lumière (Planche 13, fig. 1), soit localisées entre les cellules où elles dissocient la lamelle moyenne et écartent les parois primaires (Planche 13, fig. 2); elles sont alors disposées en file.

Les hyphes montrent un vacuome formé d'une multitude de petites vacuoles arrondies, qui contiennent souvent un granule de polyphosphate (Planche 15, fig. 2; Planche 17, fig. 6). Cet aspect du vacuome est caractéristique des Endogonacées.

Le cytoplasme fongique renferme parfois de fortes condensations de glycogène marqué par le test PATAg (Planche 13, fig. 1).

Les hyphes ne sont pas indépendantes les unes des autres, mais sont enrobées dans une substance fibrillaire qui occupe tous les espaces libres (Planche 13, figs. 1 et 2).

Cette substance est nettement marquée par les réactions d'identification des polysaccharides (Planche 13, fig. 1) et des protéines (Planche 13, fig. 3), révélant ainsi sa nature glycoprotéique. Elle constitue un ciment interhyphal. Ce dernier ne présente pas un aspect homogène, sa structure est souvent lâche et permet de bien distinguer les fibrilles qui le composent. Ces fibrilles glycoprotéiques s'organisent en une couche continue, plus dense autour des hyphes (Planche 14, fig. 1). Cette couche semble émettre des digitations dans la partie moins dense.

Pour aller plus loin dans la détermination des composés polysaccharidiques, nous avons utilisé un complexe lectine-or colloïdal. La lectine employée est la WGA qui révèle la présence de chitine en reconnaissant la N-acétyl-D-glucosamine.

Le marquage à l'or colloïdal apparaît intense et régulièrement réparti dans les couches pariétales des hyphes intercellulaires (Planche 17, figs. 3 à 5; Planche 18, fig. 1). Lorsque l'on est en présence de proliférations internes (Planche 17, fig. 5), les différentes couches pariétales, témoins de la succession de plusieurs vagues de croissance, sont toutes également réactives (Planche 17, figs. 3 et 4).

Le ciment interhyphal révélé au niveau des méats par les tests cytochimiques classiques, ne montre aucun marquage par l'or colloïdal (Planche 17, figs. 3 et 4).

Aucune particule d'or n'est présente dans les témoins (Planche 17, fig. 6).

#### 3.2.1.2. Les structures intracellulaires.

Les cellules du cortex racinaire qui ne sont pas infectées présentent une large vacuole centrale; leur cytoplasme est réduit à une mince pellicule pariétale (Planche 14, fig. 3) et renferme des amyloplastes (Planche 14, fig. 4).

Comme l'a montré l'observation en microscopie photonique de coupes semi-fines, les arbuscules sont présents dans les cellules les plus proches du cylindre central (Planche 14, fig. 2). Les cellules du cortex externe ne renferment que des pelotons mycéliens.

Nous nous sommes essentiellement intéressés aux cellules renfermant des arbuscules, et plus particulièrement à leur évolution, depuis la pénétration jusqu'à la dégénérescence des structures fongiques.

La pénétration s'effectue à partir d'une ramification d'une hyphe intercellulaire qui perfore la paroi de l'hôte. Le passage de l'hyphe à travers la paroi résulte, tout au moins en partie, d'une forte poussée mécanique et il peut arriver que la paroi de l'hyphe pénétrante se déforme sous cette poussée (Planche 15, fig. 1). La paroi de l'hyphe pénétrante est toujours doublée par une couche d'apposition, nettement raccordée à la paroi de la cellule-hôte (Planche 15, fig. 2). Parfois, juste au niveau de la paroi rompue de la cellule-hôte, le cytoplasme fongique montre un corps multivésiculaire (Planche 15, fig. 3). Dans l'hyphe pénétrante, le noyau occupe une position apicale (Planche 15, fig. 2).

L'hyphe qui a pénétré dans la cellule se ramifie abondamment pour former un arbuscule (Planche 15, figs. 4 et 5). Le plasmalemme de la cellule-hôte n'est jamais rompu (Planche 15, fig. 1) et il entoure toutes les branches de l'arbuscule (Planche 16, figs. 1 et 4).

Les interfaces sont classiques (types IT 21 et IT 24, BRACKER et LITTLEFIELD 1973) et comprennent: le plasmalemme de l'hôte, la matrice, la couche d'isolement plus ou moins importante, la paroi fongique et le plasmalemme du champignon (Planche 16, figs. 1, 6).

Le plasmalemme de l'hôte qui borde l'interface, bourgeonne de formations plasmalemmiques (Planche 15, fig. 3) composées soit d'éléments lamellaires empilés, soit d'une multitude de vésicules de tailles variées.

Plus rarement, au niveau de l'endophyte, des formations plasmalemmiques sont observées dans les sections arbusculaires (Planche 16, fig. 2).

L'épaisseur de la matrice est plus ou moins importante suivant les branches, sans que nous ayons pu mettre en relation ces variations avec un stade d'évolution des branches de l'arbuscule. Au niveau de l'interface, des fibrilles sont présentes: fixées sur le plasmalemme de l'hôte, libres dans la matrice (planche 16, fig. 1) ou encore formant un dépot continu d'une densité importante au contact de la paroi fongique ( Planche 16, fig. 6). La réaction de SWIFT (planche 16, fig. 5) et le test PATAg (Planche 16, figs. 2, 4 et 6) mettent en évidence leur nature glycoprotéique.

Dans les hyphes présentant un caractère juvénile, le cytoplasme est dense et riche en organites (Planche 16, fig. 2). En vieillissant, les hyphes se vacuolisent. Elles peuvent accumuler des réserves sous forme de granules de polyphosphate (Planche 15, fig.6).

Lorsque l'arbuscule dégénère, les hyphes se vident de leur contenu cytoplasmique et leurs parois s'effondrent (Planche 16, fig. 2). Ce sont les branches les plus fines qui meurent les premières, puis les grosses branches et finalement le tronc de l'arbuscule (Planche 15, fig. 6).

Nous avons utilisé le complexe WGA-or colloïdal pour détecter la présence de chitine au niveau de l'interface.

La paroi des grosses branches de l'arbuscule apparaît fortement marquée (Planche 18, fig. 2), au contraire les fines branches ne révèlent que quelques particules d'or colloïdal dans leur paroi (Planche 18, figs. 2 et 3). Lorsque l'arbuscule est mort, les parois fongiques restent

Lorsque l'arbuscule est mort, les parois fongiques restent marquées; les particules d'or sont plus ou moins abondantes dans certaines zones de l'arbuscule effondré (Planche 18, fig. 4).

Les témoins ne présentent aucun marquage dans les parois des hyphes intercellulaires ou arbusculaires (Planche 18, figs. 5 à 7).

Dans les cellules renfermant un arbuscule dont la majeure partie des branches est vivante, le cytoplasme enrobe d'une couche épaisse toutes les branches de l'arbuscule (Planche 15, fig. 5); et l'appareil vacuolaire reste très important (Planche 15, figs. 4 et 5). L'image de sections de cellules infectées, suggère l'existence d'une énorme vacuole traversée par d'épaisses travées cytoplasmiques contenant le champignon (Planche 15, fig. 5).

Le cytoplasme de la cellule-hôte renferme de nombreuses mitochondries (Planche 16, fig. 4); le réticulum endoplasmique est bien développé et présente des contacts avec le plasmalemme de l'hôte (Planche 16, fig. 4).

Le noyau montre un contour lobé. Le nucléoplasme est granuleux (Planche 17, fig. 1).

Toutefois, les organites paraissant présenter les modifications les plus remarquables sont les plastes. Dans les

cellules sans endophyte, les plastes sont des amyloplastes (Planche 14, fig. 4). Dans les cellules renfermant un arbuscule vivant, ce sont des leucoplastes dont l'organisation (réseau de tubules matriciels, plastoglobules) évoque une fonction sécrétrice (planche 16, figs. 2 et 6). Lorsque l'arbuscule est mort, les plastes sont des amyloplastes (Planche 17, fig. 2). Des formes intermédiaires entre les leucoplastes et les amyloplastes sont observées dans les cellules renfermant un arbuscule dégénérescent. Le stroma de ces plastes contient des grains d'amidon, des plastoglobules et un réseau de tubules colorés par le test PATAg (Planche 16, fig. 3; Planche 17, fig.1). Ce sont probablement des leucoplastes se transformant en amyloplastes.

Les cellules corticales externes, qui contiennent un peloton, montrent des caractères sensiblement différents. Le cytoplasme est réduit alors que la vacuole est très importante.

Les hyphes sont doublées d'une couche d'isolement bien individualisée, et les plastes sont des amyloplastes (Planche 14, fig. 5).

L'interface est de type IT 21 (BRACKER et LITTLEFIELD 1973).

Enfin, dans les cellules sans endophyte, proches des cellules infectées, nous avons souvent observé des accumulations importantes de tanins (Planche 15, fig.6).

# <u>3.2.2. Les mycorhizes prélevées sur la station de</u> <u>Brabois.</u>

# 3.2.2.1. Les hyphes intercellulaires.

Les hyphes sont nombreuses et disposées en file ou en amas dans les méats (Planche 19, fig. 1). Les vacuoles contiennent des granules de polyphosphate (Planche 19, fig. 2).

Elles sont enrobées dans un ciment interhyphal constitué de fibrilles polysaccharidiques nettement marquées par le test PATAg (Planche 19, figs. 3 et 5).

# 3.2.2.2. Les structures intracellulaires.

Dans les mycorhizes récoltées sur le site de Brabois, comme dans toutes celles que nous avons précédemment décrites, les pelotons sont localisés dans les cellules externes, et les arbuscules dans les cellules plus profondes du cortex racinaire (Planche 21, fig.4). La pénétration du champignon dans une cellule-hôte se fait à partir d'une ramification latérale d'une hyphe intercellulaire (Planche 19, fig. 5) qui rompt la paroi de la cellule-hôte. Certains clichés particulièrement favorables (Planche 19, fig. 5), montrent que la cellule-hôte réagit, en déposant du matériel pariétal face au champignon, avant même que la paroi soit totalement perforée.

Après pénétration dans la cellule-hôte, l'endophyte s'y développe en un arbuscule. Les cellules voisines non infectées peuvent se tanifier (Planche 19, fig. 4)

Au niveau de l'arbuscule, les interfaces présentent une organisation tout à fait classique. La matrice contient des fibrilles de nature glycoprotéique, comme le montrent les réactions au test PATAg (Planche 20, figs. 1 et 2) et à la coloration des protéines de SWIFT (Planche 21, fig. 1).

Les formations membranaires, tant dans le cytoplasme de l'hôte que dans celui du champignon, sont importantes (Planche 19, fig. 6; Planche 20, fig. 3). La coloration des membranes par l'acide phosphotungstique (Planche 20, fig. 6) et leur réactivité au test PATAg (Planche 20, figs. 1 et 2) confirment qu'il s'agit de formations plasmalemmiques. Chez l'hôte, ces formations sont associées à des fibrilles polysaccharidiques (Planche 20, figs. 1 et 2).

Dans les cellules abritant un arbuscule vivant, le cytoplasme est dense (Planche 20, fig.3). Il est parcouru par un réseau de réticulum endoplasmique très important, avec des travées particulièrement développées dans les zones renfermant des sections de l'endophyte (Planche 21, fig. 2). Les polyribosomes sont nombreux (Planche 20, fig. 3). Les dictyosomes présentent un empilement de 5 à 7 saccules (Planche 20, fig. 3). Les mitochondries sont abondantes (Planche 21, fig. 2). La transformation plastidiale conduit à la formation de leucoplastes sécréteurs avec un réseau de tubules matriciels marqués par le test PATAg (Planche 21, fig. 3).

Il faut cependant noter que, dans les cellules infectées, malgré le développement du cytoplasme de l'hôte, le volume vacuolaire reste important (Planche 19, fig. 4; Planche 21, fig. 4).

Nous observons la présence dans les cellules corticales externes de pelotons mycéliens. Ces cellules ne montrent pas de modifications remarquables du cytoplasme, qui reste réduit à un mince film pariétal autour des hyphes et le long des parois (Planche 21, figs. 5 et 6).

Les parois des hyphes sont doublées d'une couche d'isolement bien individualisée (Planche 21, figs. 5 et 6).

Nous avons observé le passage direct d'une hyphe d'un peloton d'une cellule à une autre (Planche 21, fig. 5).

# 3.2.3. Suivi de la mycorhization en fonction des saisons.

Cette étude a été effectuée sur le site de Sexey-aux-Forges. Elle porte sur une période de deux ans, avec des prélèvements réguliers, permettant d'étudier l'évolution des mycorhizes au cours des saisons.

Quel que soit le mois de prélèvement, nous avons toujours trouvé sur le système racinaire des rejets de merisiers, de jeunes racines susceptibles de former des mycorhizes. Le reste du système racinaire est subérifié (brun et coriace).

Les mycorhizes observées sont de type vésiculo-arbusculaire. Nous n'avons jamais rencontré d'autres types de mycorhize dans les racines des rejets de merisiers.

L'organisation de ces mycorhizes ayant été décrite en détail précédemment, nous nous limiterons pour ce suivi à estimer l'état de la mycorhization.

Les résultats sont présentés par saison.

#### <u>En automne</u>

Sur les racines de rejets de merisiers prélevés en automne, nous observons la présence de mycorhizes VA.

Le réseau d'hyphes intercellulaires est important. Les hyphes sont bien vacuolisées mais peu de granules de polyphosphate sont présents dans les vacuoles (Planche 22, fig. 1).

Les cellules de l'hôte renferment des arbuscules vivants bien développés (Planche 22, figs. 1 et 4) et des arbuscules dégénérescents ou morts (Planche 22, fig. 3).

L'aspect du cytoplasme des cellules-hôtes, très riche en mitochondries, avec un réticulum endoplasmique bien développé, indique que les cellules de l'hôte sont actives (Planche 22, figs. 3 et 4).

Des pelotons sont visibles dans les cellules du cortex externe (Planche 22, fig. 2). Ces cellules accumulent des tanins.

#### En hiver

Les conditions climatiques au moment des prélèvements ont été très variables, soit avec un temps doux et pluvieux, soit avec un sol gelé superficiellement, ou encore avec un sol en début de dégel après une période de grand froid. Dans tous les cas, nous avons observé des arbuscules vivants (Planche 23, figs. 2 et 3), dégénérescents ou morts (Planche 23, fig. 5), ainsi que des pelotons (Planche 23, fig. 4).

Les hyphes intercellulaires sont également abondantes (Planche 23, fig. 1).

Des mycorhizes prélevées en février après une période de grand froid, présentent des hyphes intercellulaires abondantes dont les vacuoles contiennent souvent de nombreux granules de polyphosphate (Planche 24, fig. 1). Les arbuscules sont alors peu développés (Planche 24, fig. 2). L'endophyte semble pourtant bien vivant et l'on peut observer des amorces de pénétration dans les cellules de l'hôte (Planche 24, fig. 3).

#### Au printemps

Nous avons prélevé des rejets en début de végétation, avec des bourgeons débourrants, puis les rejets ayant développé leurs feuilles, ce qui correspond à deux situations métaboliquement différentes pour la plante-hôte. Dans tous les cas, des mycorhizes V.A. sont présentes dans les racines.

Nous avons réalisé au début du printemps (mars), un prélèvement aprés une période de gel. Nous n'avons retrouvé alors, que peu d'arbuscules vivants. Les arbuscules morts ou dégénérescents sont abondants (Planche 24, fig. 4). De nombreux granules de polyphosphate ainsi que des inclusions lipidiques, sont présents dans les vacuoles des hyphes intercellulaires (Planche 24, fig. 5). Les cellules corticales externes renferment des pelotons (Planche 25, fig. 1)

En avril, les cellules infectées sont abondantes. Nous avons décrit ces mycorhizes en détail dans le paragraphe correspondant à l'étude des mycorhizes prélevées sur le site de Sexey-aux-Forges.

#### <u>En été</u>

Les hyphes intercellulaires sont nombreuses (Planche 25, fig. 2). Des arbuscules vivants (Planche 25, figs. 3 à 6), dégénérescents ou morts (Planche 25, fig. 2) sont présents dans les cellules corticales les plus internes.

Les cellules renfermant un peloton peuvent accumuler des tanins (Planche 25, fig. 4).

### 4. DISCUSSION ET CONCLUSION.

#### 4.1. LES MYCORHIZES "NATURELLES" DU MERISIER.

L'étude en microscopie photonique des racines de rejets de merisier révèle la présence d'hyphes intercellulaires, de vésicules et d'arbuscules. En microscopie électronique, les caractères ultrastructuraux de l'endophyte (absence de cloison, morphologie du système vacuolaire) montrent qu'il s'agit bien d'une Endogonacée.

Les hyphes intercellulaires sont extrêmement abondantes. Elles sont: soit disposées en file et localisées entre les cellules, soit groupées en amas au niveau des méats dont elles peuvent occuper toute la lumière.

Elles ne sont pas indépendantes les unes des autres mais enrobées dans un ciment. Des études cytochimiques (test PATAg: THIERY 1967) ont montré que ce ciment interhyphal est de nature polysaccharidique. La réaction de mise en évidence des protéines (SWIFT 1968) fait également apparaître une composante protéique.

L'aspect de ce système d'hyphes intercellulaires observé dans la mycorhize "naturelle" sur les deux sites de prélèvement apparaît comme nouveau.

Il évoque par le nombre élevé des hyphes et la présence d'un ciment, un pseudoréseau de HARTIG.

Ce type de mycorhize récolté dans les conditions naturelles pourrait être l'équivalent, pour les mycorhizes à Endogonacée, des ectendomycorhizes observées avec d'autres agents mycorhizogènes et qui rassemblent les caractères ultrastructuraux des endomycorhizes (présence intracellulaire du champignon) et des ectomycorhizes (manchon mycélien, réseau de Hartig).

Actuellement les ectendomycorhizes sont signalées chez les pins, chez des hôtes de la famille des Arbutacées, des Pyrolacées (mycorhizes arbutoïdes) et des Monotropacées (mycorhizes monotropoides) (PETERSON *et al.* 1980; SCANNERINI et BONFANTE-FASOLO 1982; FUSCONI et BONFANTE-FASOLO 1984; ROBERTSON et ROBERTSON 1985).

Dans les objets étudiés, la répartition du champignon est classique: les cellules corticales les plus externes renferment des pelotons, les arbuscules se situent dans les cellules les plus proches de l'endoderme. Ceci a déjà été décrit chez d'autres associations de type vésiculo-arbusculaire (KINDEN et BROWN 1975 a et b; BONFANTE-FASOLO et SCANNERINI 1977; BONFANTE-FASOLO 1978; SWARD 1978; MARX 1981; BONFANTE-FASOLO 1984; BONFANTE-FASOLO et FONTANA 1985; JACQUELINET-JEANMOUGIN 1986; KREUTZ-JEANMAIRE *et al.* 1988 a; BOUDARGA 1989). L'arbuscule se forme à partir d'une ramification latérale d'une hyphe intercellulaire.

Dans le cytoplasme fongique, nous signalons la présence de corps multivésiculaires au niveau de la paroi perforée. Ces corps avaient déjà été décrits dans les mycorhizes de merisiers et de pommiers obtenues en conditions contrôlées. Le fait de les observer dans les conditions naturelles, nous renforce dans l'idée que cette présence n'est pas fortuite (provoquée par les conditions de culture par exemple). Ces corps multivésiculaires interviendraient dans le processus de lyse enzymatique de la paroi cellulaire lors de la pénétration.

La seconde phase de la pénétration est mécanique, le champignon après avoir en partie détruit la paroi cellulaire, pousse sur cette structure désorganisée. Des déformations de la paroi fongique peuvent être induites par cette forte poussée.

L'hyphe pénétrante se ramifie ensuite dichotomiquement pour former un arbuscule. Le plasmalemme de la cellule-hôte n'est jamais rompu. La structure arbusculaire est classique. La formation d'un arbuscule entraîne de profonds remaniements de la cellule-hôte: augmentation du volume cytoplasmique, régression du volume vacuolaire, abondance des organites cellulaires et transformation des plastes en leucoplastes.

Les cellules corticales externes renferment des pelotons. Ils sont signalés dans certaines mycorhizes à vésicules et arbuscules (KINDEN et BROWN 1975 a et b; MALAJCZUK 1981; MARX 1981; JACQUELINET-JEANMOUGIN et GIANINAZZI-PEARSON 1983; JACQUELINET-JEANMOUGIN 1986; BONFANTE-FASOLO et FONTANA 1985; BOUDARGA et DEXHEIMER 1988; SMITH et GIANINAZZI-PEARSON 1988; KREUTZ-JEANMAIRE *et al.* 1988 a). La paroi des hyphes est doublée d'une épaisse couche de nature polysaccharidique. L'hyphe pénétrante s'enroule dans la cellule sans pouvoir y développer un arbuscule; l'hôte réagit en déposant une épaisse couche d'isolement au contact du champignon. Les plastes sont peu ou pas modifiés, ils gardent une structure d'amyloplaste.

L'utilisation d'une lectine, la WGA complexée à l'or colloïdal, nous a permis de révéler la présence de résidus de N-acétyl-D-glucosamine dans les parois fongiques.

Ce sucre entre dans la composition de la chitine, et a été signalé comme étant un composé majeure des parois des Endogonacées (BONFANTE-FASOLO 1982; BONFANTE-FASOLO *et al.* 1986 b; JABAJI-HARE et CHAREST 1987; GRANDMAISON *et al.* 1988; JABAJI-HARE *et al.* 1990).

Le marquage à l'or colloïdal est plus intense au niveau des parois des hyphes intercellulaires que sur les parois des hyphes intracellulaires. De même, pour les hyphes arbusculaires, les particules d'or sont plus abondantes et régulièrement réparties sur les parois des grosses branches, que sur celles des fines branches. Cette diminution des sites de reconnaissance de la WGA dans les parois des hyphes intracellulaires et arbusculaires a été également signalée par BONFANTE-FASOLO et GRIPPIOLO (1982) pour Glomus fasciculatus, par GRANDMAISON et al. (1988) pour Gigaspora margarita et par JABAJI-HARE et al. (1990) pour Glomus clarum. D'après BONFANTE-FASOLO et GRIPPIOLO (1982) une telle

D'après BONFANTE-FASOLO et GRIPPIOLO (1982) une telle diminution correspondrait à une simplification des structures pariétales quand le champignon pénètre dans la cellule.

Par ailleurs, GIANINAZZI-PEARSON *et al.* (1981) signalent une diminution de l'épaisseur des parois fongiques des hyphes intercellulaires aux hyphes arbusculaires les plus fines.

La paroi de l'endophyte se modifie et se simplifie depuis la phase extraracinaire jusqu'à la phase intraracinaire: elle devient plus mince, sa charpente ultrastructurale change, ses caractères cytochimiques sont modifiés et sa réaction positive à la WGA diminue (voir tableaux récapitulatifs p. 73).

Au niveau des hyphes arbusculaires, les résidus de N-acétyl-D-glucosamine sont présents sous forme de courts oligomères, et leur polymérisation en microfibrilles de chitine n'est plus accomplie (BONFANTE-FASOLO 1982; JABAJI-HARE *et al.* 1990).Cette simplification se ferait progressivement au niveau de l'arbuscule, ce qui explique que les grosses branches (ou le tronc) soient plus marquées que les branches les plus fines.

Quand l'arbuscule est mort, le marquage plus ou moins abondant de certaines zones, s'explique par la présence des parois collapsées des grosses branches et du tronc, qui ont une plus forte concentration de particules d'or que les parois des fines branches.

JABAJI-HARE *et al.* signalent également la présence de résidus de N-acétyl-D-glucosamine dans le cytoplasme du champignon et de la cellule-hôte. Nous n'avons pas observé cette localisation dans les mycorhizes de merisier. Nous pensons que ce marquage au niveau du cytoplasme correspond à un artéfact; car sur les clichés de ces auteurs, les particules d'or sont uniformément réparties dans toute la cellule y compris dans les vacuoles.

#### SIMPLIFICATION DES PAROIS DES HYPHES EXTERNES AUX H. ARBUSCULAIRES

★ Diamètre et épaisseur (⊭m) des parois des hyphes de trois champignons mycorhiziens d'après GIANINAZZI-PEARSON *et al.* (1981)

Champignons mycorhiziens			Hyphes intracellulaires			
	Hyphes i <b>nter</b> cellulaires		Tronc de l'arbuscule et grosses branches		Fines branches de l'arbuscule	
	Diamètre	Epaisseur paroi	Diamètre	Epaisseur paroi	Diamètre	Epaisseur paroi
E <sub>3</sub> Glomus mosseae Glomus tenuis	2—10 4—10 1—2	0,10-0,30 0,15-0,20 0,03-0,06	2—9 3—8 1—2	0,100,30 0,100,20 0,040,06	0,50—1,50 0,80—3,00 0,30—0,50	0,02—0,08 0,02—0,05 <0,02

★Composition chimique des parois des hyphes de Glomus fasciculatus d'après BONFANTE-FASOLO et GRIPPIOLO (1982).

Hyphes	extraracinaires	chitineuses et stratifiées glucanes insolubles en milieu alcalin glucanes solubles en milieu alcalin protéines
Hyphes	des pelotons	organisation en couches chitineuses moins évidente glucanes insolubles en milieu alcalin glucanes solubles en milieu alcalin protéines
Hyphes	intercellulaires	traces de glucanes insolubles en milieu alcalin glucanes solubles en milieu alcalin protéines
Hyphes	arbusculaires	traces de glucanes insolubles en milieu alcalin glucanes solubles en milieu alcalin protéines

★La paroi de l'endophyte se modifie et se simplifie depuis la phase extraracinaire jusqu'à la phase intraracinaire:

1) elle devient de plus en plus mince des hyphes extraracinaires aux hyphes arbusculaires les plus fines

2) sa charpente ultrastructurale change, passant d'une structure plurilamellaire (hyphes externes, pelotons) à une structure unistratifiée (hyphes intercellulaires et arbusculaires)

3) les caractères cytochimiques sont modifiés.

4) la réaction positive à la WGA diminue depuis les hyphes intercellulaires jusqu'aux fines branches arbusculaires. A ce niveau la polymérisation de la chitine ne se ferait plus, læ N-acétyl-glucosamine serait présent sous forme isolée ou associé en courtes chaines. Nous avons noté de profondes différences au niveau des hyphes intercellulaires:

- Dans les mycorhizes obtenues en conditions contrôlées avec un endophyte déterminé (*Glomus intraradices* ou *Glomus mosseae*) les hyphes intercellulaires sont peu nombreuses. Elles sont souvent étroitement accolées à la paroi de l'hôte et peuvent présenter des digitations de leur paroi, permettant un ancrage de l'hyphe dans le méat.

- Dans les mycorhizes "naturelles", on observe un important réseau d'hyphes intercellulaires enrobées dans un ciment interhyphal de nature glycoprotéique. Il évoque un pseudoréseau de Hartig. Ce phénomène peut être soit induit par l'endophyte (différent de *Glomus intraradices* ou de *Glomus mosseae*), soit résulter de la formation de la mycorhize en conditions naturelles (intervention des facteurs externes).

L'organisation des arbuscules dans les mycorhizes prélevées dans la nature ne diffère en rien de celle que nous avons décrite dans les mycorhizes obtenues en conditions contrôlées. Nous pouvons cependant noter quelques particularités:

- L'augmentation du volume cytoplasmique de l'hôte n'atteint pas les proportions considérables observées dans l'association mycorhizienne merisier / *Glomus intraradices*. Dans la mycorhize "naturelle" le volume vacuolaire reste important.

- La proportion des hyphes arbusculaires vacuolisées est très importante dans les cellules corticales des merisiers prélevés dans la nature. Ce phénomène est certainement à relier aux conditions naturelles où l'âge des infections n'est pas connu.

- Dans les mycorhizes récoltées sur le site de Brabois, le plasmalemme de l'hôte produit de nombreuses formations plasmalemmiques au contact des hyphes arbusculaires.

Dans les mycorhizes "naturelles", comme dans les mycorhizes obtenues en conditions contrôlées, l'augmentation du volume cytoplasmique dans les cellules renfermant un arbuscule vivant entraîne des modifications dans l'organisation générale de la cellule-hôte. Les mitochondries sont abondantes. Le réticulum endoplasmique se développe considérablement et des contacts entre ses travées et la membrane périsymbionte sont observés, les polyribosomes sont nombreux.

Nous observons dans ces mycorhizes "naturelles", la transformation des plastes en leucoplastes sécréteurs dans les cellules abritant un arbuscule vivant. L'hôte réagit donc à l'établissement des structures fongiques intracellulaires de la même façon que dans la mycorhize obtenue en conditions contrôlées.

<u>En conclusion</u>, l'organisation ultrastructurale des hyphes intracellulaires (arbuscules et pelotons) des mycorhizes "naturelles" et des mycorhizes obtenues en conditions contrôlées, ne présente pas de différences significatives. Par contre, le réseau d'hyphes intercellulaires présente des modifications importantes.

# 4.3. Etude de l'évolution de la mycorhize sur une année de végétation.

Nous avons observé la présence de mycorhizes fonctionnelles (arbuscules vivants, augmentation du volume cytoplasmique de l'hôte, présence de nombreuses mitochondries, de polyribosomes, développement du réticulum endoplasmique) durant toute l'année.

Mais, si ces mycorhizes sont présentes toute l'année, elles sont plus ou moins actives suivant la saison et l'état physiologique de la plante-hôte.

Dans les vacuoles fongiques, la présence et l'abondance de granules de polyphosphate varient au cours des saisons. Ils sont particulièrement nombreux aux mois de février et mars. L'accumulation de ces granules de polyphosphate indique leur non-utilisation, et donc une symbiose peu active. Ceci est à mettre en relation avec l'état physiologique de la plante-hôte, qui a une vie latente à cette période de l'année.

Certains auteurs qui ont étudié les endomycorhizes à vésicules et arbuscules en conditions naturelles signalent au cours des saisons, soit une variation du taux de mycorhization et du nombre de spores présentes dans le sol (GIOVANNETTI 1985; DICKMAN *et al.* 1984; NICOLSON *et* JOHNSTON 1979), soit une disparition des arbuscules vivants à certaines périodes de l'année (MARX 1981).

Des études menées sur l'érable (MARX 1981) ont révélé la présence d'arbuscules vivants, uniquement pendant les mois de septembre et octobre. En novembre et décembre, quelques éléments arbusculaires sont encore présents. Pendant le reste de l'année, cet auteur n'a observé que des arbuscules morts à divers degrés de dégradation, ainsi que la présence de bactéries, de champignons saprophytes et parasites dans les cellules-hôtes.

NICOLSON et JOHNSTON (1979) ont étudié des mycorhizes de graminées maritimes infestées par *Glomus fasciculatum*. Ils observent que l'infection est maximum en juin-juillet et en septembre-octobre, mais qu'elle persiste de façon importante pendant l'hiver.

GIOVANNETTI (1985) s'est également intéressé à la variation saisonnière du taux de mycorhization de la flore des dunes. Il rencontre le plus fort pourcentage d'infection pour Ammophila arenaria (L) et Helichrysum stoechas (L) en mai-juin, c'est-à-dire pendant la période de floraison.

BONFANTE-FASOLO (1978) a étudié la morphologie des mycorhizes de *Vitis vinifera* prélevées mensuellement en conditions naturelles. Cet auteur observe une infection importante du système racinaire tout au long de l'année.

En fait, la plupart des auteurs, sans observer de disparition des mycorhizes, notent suivant le mois de prélèvement, la nature de la plante-hôte et les conditions climatiques, des variations du nombre de spores présentes dans le sol et des fluctuations dans le pourcentage de mycorhization des plantes-hôtes étudiées.

Sur le système racinaire des rejets de merisier, nous avons retrouvé à chaque prélèvement la présence de jeunes racines se distinguant des vieilles racines subérisées par leur couleur claire (jaunâtre). Ces jeunes racines également appelées "suçoirs" apparaissent régulièrement, ce sont elles qui en se divisant donnent un aspect dense et particulier au chevelu racinaire des merisiers. Ces "suçoirs" réapparaissent rapidement après une période de gel par exemple (LEMOINE, comm. pers.).

Du fait de ce renouvellement rapide et de la présence de spores dans le sol, le système racinaire est potentiellement mycorhizable toute l'année. L'infection progresse également dans la racine par l'intermédiaire du réseau d'hyphes intercellulaires.

NAPPI (1983) a étudié la variation saisonnière du taux de mycorhization des pommiers en fonction de différents traitements des sols. Ces études sont particulièrement intéressantes puisqu'elles concernent également une Rosacée ligneuse.

Cet auteur conclut que le taux de mycorhization, quel que soit le traitement, est le plus bas au printemps, et qu'il augmente ensuite de juillet jusqu'en janvier. Il ne signale pas de disparition des mycorhizes sur le système racinaire des pommiers.

Dans notre étude, nous nous sommes limitée à des observations cytologiques, en notant la présence ou l'absence d'arbuscules vivants. Nous n'avons pas estimé le pourcentage de racines mycorhizées. Il se peut donc qu'il existe également chez le merisier, des variations dans l'intensité de la mycorhization en fonction du mois de prélèvement.

L'étude de la fluctuation du taux d'infection est de toute manière complexe à interpréter. Le problème des études faites en conditions naturelles est qu'il est difficile de distinguer les effets dûs à la saison, de ceux en relation avec la physiologie de la plante (débourrement des bourgeons, apparition des feuilles, éventuellement floraison, formation des fruits, chute des feuilles...) auxquels viennent encore s'ajouter les problèmes de croissance racinaire (existence de vagues ou croissance continue) ou les incidents climatiques (forte pluie ou sécheresse sans rapport avec la saison).

<u>En conclusion</u>, pour le merisier, la présence d'arbuscules vivants est liée à la croissance racinaire et donc à l'apparition de jeunes racines susceptibles d'être infectées. Tout ce qui entrave la formation de ces racines (gel, sécheresse) influe, faute de nouvelles cellules à infecter, sur le taux de mycorhization. Pendant ces conditions climatiques défavorables, le champignon reste présent dans le sol (spores) et dans la racine (hyphes intercellulaires). Quand la croissance racinaire reprend (apparition de nouveaux "suçoirs"), le partenaire fongique infecte rapidement ces nouvelles racines. Les mycorhizes formées sont plus ou moins actives suivant les saisons, ce qui est à mettre en relation avec l'état physiologique de la plante-hôte et plus particulièrement sa production de photosynthétats.

# N° 11 à 25

# PHOTOGRAPHIQUES

# PLANCHES

Mycorhizes de merisiers prélevés dans la nature. Observations au microscope photonique. Coloration par le bleu Trypan.

<u>Figure 1:</u> L'endophyte apparaît coloré en bleu, sous forme d'hyphes intercellulaires ou de formations arbusculaires. (X 1025)

<u>Figure 2:</u> Détail d'une cellule abritant un arbuscule. (X 1600)

,

<u>Figure 3:</u> Cortex racinaire renfermant des vésicules. (X 1025)

Figure 4: Formation d'un peloton dans les couches corticales externes. (X 400)



Mycorhizes de merisiers prélevés dans la nature. Observations au microscope photonique. Coupes semi-minces / Coloration par le bleu de toluidine.

Figures 1 et 2: Mycorhizes prélevées sur la station de Brabois (figure 1) ou sur la station de Sexey-aux-Forges (figure 2). Les formations arbusculaires sont présentes dans les couches les plus proches du cylindre central. Les cellules du cortex externe renferment des pelotons. Noter l'abondance des hyphes intercellulaires et leur disposition en file ou en amas. (X 640) (X 400)

<u>Figure 3:</u> Détail d'une section transversale. Les cellules corticales renferment des pelotons. (X 1600)

Figure 4: Détail d'une section transversale. Les cellules directement en contact avec l'endoderme contiennent des arbuscules. (X 1600)

,



Ultrastructure des mycorhizes "naturelles" de merisier. Station de Sexey-aux-Forges. Prélèvement: avril.

# Figure 1:

Test PATAg.

Les hyphes intercellulaires sont souvent groupées au niveau des méats dont elles occupent toute la lumière. Elles sont enrobées dans une substance fibrillaire nettement marquée par le test d'identification des polysaccharides.

(X 15500)

# Figure 2:

Test PATAg.

Les hyphes intercellulaires peuvent également être disposées en file entre les cellules dont elles dissocient la lamelle moyenne et écartent les parois primaires. (X 6000)

#### Figure 3:

Réaction de SWIFT.

Le ciment qui entoure les hyphes intercellulaires est marqué par la réaction de mise en évidence des protéines. Une hyphe intercellulaire émet une ramification latérale qui pénètre dans la cellule et s'y ramifie en un arbuscule. (X 11000)



Ultrastructure des mycorhizes "naturelles" de merisier. Station de Sexey-aux-Forges. Prélèvement: avril

<u>Figure 1:</u> Acétate d'uranyle - Citrate de plomb. Le ciment interhyphal présente une structure fibrillaire lâche qui s'organise en une couche continue plus dense autour des hyphes. (X 51000)

Figure 2: Test PATAg. Les arbuscules sont abondants dans les cellules proches du cylindre central. L'endoderme est une barrière infranchissable pour le champignon. (X 7000)

Figure 3: Test PATAg. Les cellules corticales non infectées présentent une large vacuole centrale, le cytoplasme est réduit à un mince film pariétal. Ces cellules peuvent se charger en tanins (CcT). (X 3000)

Figure 4: Test PATAg. Le cytoplasme des cellules non infectées renferme des amyloplastes. (X 13500)

.

<u>Figure 5:</u> Test PATAg. Cellule avec une seule hyphe qui s'enroule en un peloton. L'hyphe est doublée d'une couche d'isolement importante. Les plastes renferment de gros grains d'amidon. (X 10000)


Ultrastructure des mycorhizes "naturelles" de merisier. Station de Sexey-aux-Forges, Prélèvement: avril. Figure 1: Acétate d'uranyle - Citrate de plomb. La paroi de l'hyphe pénétrante s'est déformée (flèches) sous la poussée mécanique du champignon qui entraîne la rupture de la paroi de la cellule-hôte. (X 11500) Figure 2: Acétate d'uranyle - Citrate de plomb. La paroi de l'hyphe pénétrante est doublée par une couche d'apposition raccordée à la paroi de la cellule-hôte. Le noyau fongique occupe une position apicale. (X 9000) Figure 3: Test PATAg. Au niveau de la pénétration, le cytoplasme fongique renferme un corps multivésiculaire (flèche). Le plasmalemme de l'hôte n'est jamais rompu et vient entourer toutes les branches de l'arbuscule. Il bourgeonne des formations plasmalemmiques. (X 13000) Figure 4: Réaction de SWIFT. Cellule corticale renfermant un arbuscule vivant. Les sections arbusculaires présentent des tailles variables. (X 2500) Figure 5: Acétate d'uranyle - Citrate de plomb. Lorsque l'arbuscule est établi, le système vacuolaire reste important. (X 3500) Figure 6: Acétate d'uranyle - Citrate de plomb. Arbuscule dégénérescent: les branches arbusculaires sont effondrées; le tronc se vacuolise de façon importante. A côté des cellules infectées, d'autres cellules accumulent des tanins. (X 3000)



Ultrastructure des mycorhizes "naturelles" de merisier. Station de Sexey-aux-Forges. Prélèvement: avril. Figure 1: Acétate d'uranyle - Citrate de plomb. Au niveau de l'arbuscule, l'interface comprend: plasmalemme de l'hôte, la matrice, la couche d'apposition, le la paroi et le plasmalemme du champignon. (X 35500) Figure 2: Test PATAg. La matrice contient des fibrilles réactives au test de mise en évidence des polysaccharides. Elles peuvent être fixées sur le plasmalemme de l'hôte ou libres dans la matrice. Les formations plasmalemmiques du champignon sont également réactives au test PATAg, mais elles ne sont pas associées à un matériel fibrillaire. (X 20000) Figure 3: Test PATAg. Les plastes présentent une structure intermédiaire entre un leucoplaste sécréteur (réseau de tubules et plastoglobules) et un amyloplaste (présence de globules fortement contrastés par le test PATAg). (X 12000) Figure 4: Test PATAg. Détail d'une cellule renfermant un arbuscule vivant. Le cytoplasme de l'hôte enrobe d'une couche épaisse les contours des branches arbusculaires. Les mitochondries sont abondantes, le réticulum endoplasmique présente des contacts avec le plasmalemme de l'hôte. (X 20000) Figure 5: Réaction de SWIFT. Les fibrilles présentes au niveau de la matrice sont également réactives au test de mise en évidence des protéines. (X 23500) Figure 6: Test PATAg. Au niveau des grosses branches ou du tronc de l'arbuscule, le matériel fibrillaire s'organise en un dépot continu d'une densité importante. Le cytoplasme de l'hôte montre un leucoplaste dont le stroma renferme des plastoglobules et un réseau de tubules colorés par le test PATAg. (X 26000)



Ultrastructure des mycorhizes "naturelles" de merisier. Station de Sexey-aux-Forges. Prélèvement: avril. Test PATAg: figs. 1 et 2. Localisation de la chitine par le complexe WGA-or colloïdal: figs. 3 à 5. Figure 1: Arbuscule dégénérescent. Les hyphes se vident de leur contenu cytoplasmique et s'effondrent. Le test PATAg met en évidence un important matériel fibrillaire autour des hyphes collapsées. Les plastes renferment un réseau tubulaire réactif au test PATAg. (X 15000) Figure 2: Arbuscule mort. Seules subsistent les parois effondrées des branches arbusculaires. Les plastes sont des amyloplastes. (X 12000) Figures 3 et 4: Détails des hyphes intercellulaires de la figure 5. Toutes les couches pariétales sont marquées par l'or colloïdal. Les parois des hyphes vides sont également marquées. (X 26000) (X 32000) Figure 5: Sections d'hyphes intercellulaires. Les parois fongiques sont constituées de plusieurs couches successives. Il s'agit de proliférations internes. Deux sections d'hyphes vidées de leur contenu sont visibles dans le méat. (X 7000) Figure 6: Témoin.

La paroi de l'hyphe intercellulaire ne montre aucune particule d'or colloïdal. (X 21500)



Ultrastructure des mycorhizes "naturelles" de merisier. Station de Sexey-aux-Forges. Prélèvement: avril.

Localisation de la chitine par le complexe WGA-or colloïdal.

Figure 1: Seule la paroi de l'hyphe intercellulaire est marquée par l'or colloïdal. Les parois des cellules de l'hôte ne présentent aucune particule d'or. (X 26500)

Figure 2: La paroi fongique de la grosse branche montre un net marquage. Au contraire, la paroi des fines branches de l'arbuscule est peu marquée. (X 32500)

Figure 3:

Au niveau des fines branches de l'arbuscule, seules quelques particules d'or sont visibles sur les parois fongiques. (X 16000)

Figure 4:

Arbuscule mort. Seules subsistent les parois effondrées des hyphes. Au centre, on observe une paroi plus fortement marquée qui pourrait correspondre au tronc de l'arbuscule. (X 30000)

Figures 5 et 6:

Au niveau des témoins, aucun marquage n'est visible sur les parois des grosses branches (fig. 5) et des branches arbusculaires effondrées (fig. 6). (X 25500) (X 25500)



Ultrastructure des mycorhizes "naturelles" de merisier. Station de Brabois. Prélèvement: octobre. Figure 1: Test PATAg. Les hyphes intercellulaires sont nombreuses et disposées en amas entre les cellules corticales dont elles repoussent les parois primaires. (X 7000) Figure 2: Acétate d'uranyle - Citrate de plomb. Les hyphes intercellulaires renferment de nombreuses vacuoles de forme arrondie, caractéristiques des Endogonacées, et dont certaines contiennent un granule de polyphosphate. (X 15000) Figure 3: Test PATAg. Les hyphes intercellulaires sont enrobées dans un ciment interhyphal réactif au test de mise en évidence des polysaccharides. (X 7000) Figure 4: Test PATAg. Les cellules corticales sans endophyte présentent une large vacuole centrale. Au centre du cliché, on observe une cellule corticale qui accumule des tanins. (X 3000) Figure 5: Test PATAg. L'hyphe pénétrante perfore la paroi de la cellule-hôte qui réagit en déposant du matériel pariétal face au champignon. Le méat est rempli de fibrilles polysaccharidiques réactives au test PATAg. (X 14000)Figure 6: Acétate d'uranyle - Citrate de plomb. Détail d'un arbuscule vivant. Le plasmalemme de l'hôte n'est pas rompu et il vient entourer toutes les branches de l'arbuscule. Certaines sections de l'arbuscule présentent des formations plasmalemmiques importantes. (X 7000)



Ultrastructure des mycorhizes "naturelles" de merisier. Site de Brabois. Prélèvement: octobre.

Figure 1: Test PATAg. L'interface comprend le plasmalemme de l'hôte, la matrice, la paroi et le plasmalemme du champignon. Le plasmalemme de l'hôte bourgeonne des formations plasmalemmiques associées à des fibrilles polysaccharidiques. Ce matériel fibrillaire est également abondant dans la matrice. (X 25000) Figure 2: Test PATAg. Au niveau d'une grosse branche, le matériel fibrillaire se dépose en une couche importante. (X 26500) Figure 3: Acétate d'uranyle - Citrate de plomb. plasmalemme fongique bourgeonne des formations Le plasmalemmiques. Le cytoplasme est riche en organites. Les dictyosomes sont formés de 5 à 7 saccules empilés. (X 51000) Figure 4: Acétate d'uranyle - Citrate de plomb. Détail d'un arbuscule mort. Les branches se vident de leur contenu cytoplasmique et s'effondrent. (X 14000) Figure 5:

Acide phosphotungstique.

Cette coloration, marque nettement les plasmalemmes et les formations qui en dérivent. (X 45000)



Ultrastructure des mycorhizes "naturelles" de merisier. Site de Brabois. Prélèvement: octobre. Figure 1: Réaction de SWIFT. La réaction de mise en évidence des protéines marque le matériel fibrillaire présent dans la matrice. (X 14500) Figure 2: Test PATAg. Le cytoplasme de l'hôte est parcouru par un réseau de réticulum endoplasmique important, il présente des contacts avec le plasmalemme de l'hôte qui borde les branches de l'arbuscule. Les mitochondries sont abondantes. (X 21000) Figure 3: Test PATAg. Cellule abritant un arbuscule vivant. Les plastes sont des leucoplastes sécréteurs. (X 17500) Figure 4: Acétate d'uranyle - Citrate de plomb. Les cellules corticales externes abritent des pelotons. (X 2000) Figure 5: Test PATAg. Hyphe d'un peloton. L'endophyte n'a pu établir un arbuscule et il tente de passer directement dans une cellule corticale voisine. Dans le cytoplasme du champignon, on observe la présence d'un corps multivésiculaire (flèche) au niveau de la perforation. (X 16000) Figure 6: Test PATAg. Cellule renfermant un peloton. La paroi fongique est doublée d'une couche d'isolement bien individualisée. Les plastes renferment des grains d'amidon marqués par le test PATAg. (X 10500)



Ultrastructure des mycorhizes "naturelles" de merisier. Site de Sexey-aux-Forges. Période de prélèvement: septembre, octobre.

Acétate d'uranyle - Citrate de plomb.

<u>Figure 1:</u> Cellule renfermant un arbuscule bien développé. Les hyphes sont très vacuolisées. (X 7000)

<u>Figure 2:</u> Les cellules corticales externes renferment des pelotons. Certaines cellules accumulent des tanins. (X 2500)

<u>Figure 3:</u> Portion d'un arbuscule dégénérescent. Les hyphes se vident de leur contenu cytoplasmique et les parois s'effondrent. (X 46500)

Figure 4:

L'aspect du cytoplasme de l'hôte avec de nombreuses mitochondries et un réticulum endoplasmique bien développé, indique que les cellules de l'hôte sont vivantes et actives. (X 15000)

.



Ultrastructure des mycorhizes "naturelles" de merisier. Site de Sexey-aux-Forges. Période de prélèvement: décembre.

Acétate d'uranyle - Citrate de plomb.

Figure 1:

Les hyphes intercellulaires sont disposées en file. Elles sont enrobées dans un ciment interhyphal dense. (X 15000)

<u>Figure 2:</u> Cellule corticale abritant un arbuscule vivant. Le volume vacuolaire reste important. (X 2000)

Figure 3:

Détail d'un arbuscule. Le cytoplasme de l'hôte est riche en organites. Les plastes sont des leucoplastes sécréteurs. (X 14000)

Figure 4: Les cellules du cortex externe renferment des pelotons. (X 3000)

<u>Figure 5:</u> Arbuscule effondré. (X 17000)



Ultrastructure des mycorhizes "naturelles" de merisier. Site de Sexey-aux-Forges. Période de prélèvement: février, mars.

Acétate d'uranyle - Citrate de plomb.

<u>Figure 1:</u> Mois de février. Le réseau d'hyphes intercellulaires est important. Les vacuoles fongiques renferment de nombreux granules de polyphosphate. (X 3500)

<u>Figure 2:</u> Mois de février. Arbuscule vivant mais peu développé. (X 2500)

Figure 3: Mois de février. L'hyphe intercellulaire émet une ramification latérale qui pénètre dans la cellule-hôte, laquelle réagit en déposant du matériel polysaccharidique au niveau de la pénétration. Le plasmalemme de la cellule-hôte n'est pas rompu, il se déforme autour du point de pénétration. (X 13500)

Figure 4: Mois de mars. Arbuscule dégénérescent. Les leucoplastes sont encore présents. (X 5000)

<u>Figure 5:</u> Mois de mars. Les hyphes intercellulaires renferment des granules de polyphosphate et des inclusions lipidiques. (X 4500)



Ultrastructure des mycorhizes "naturelles" de merisier. Site de Sexey-aux-Forges. Période de prélèvement: printemps et été.

Acétate d'uranyle - Citrate de plomb.

<u>Figure 1:</u> Mois de mars. Cellule abritant un peloton. (X 4000)

Figure 2: Mois de mai. Réseau d'hyphes intercellulaires important. Certaines vacuoles fongiques contiennent un granule de polyphosphate. Les cellules en contact avec l'endoderme renferment des arbuscules morts. (X 3000)

<u>Figure 3:</u> Mois de juin. Détail d'un arbuscule vivant. Les formations plasmalemmiques de l'hôte et du champignon sont nombreuses. (X 30000)

Figure 4: Mois de juillet. Le tronc de l'arbuscule présente un diamètre important, les branches sont de sections variées. La cellule de droite renferme une hyphe d'un peloton, elle accumule des tanins. (X 3000)

Figure 5: Mois de juillet. Détail des sections arbusculaires. Les cytoplasmes de l'hôte et de l'endophyte sont riches en organites. (X 18000)



### CHAPITRE III

-

#### ETUDE ULTRASTRUCTURALE DES MYCORHIZES A VESICULES ET ARBUSCULES DU CATALPA BIGNONIOIDES Walt

#### ETUDE ULTRASTRUCTURALE DES MYCORHIZES A VESICULES ET ARBUSCULES DU CATALPA BIGNONIDIDES Wait.

#### 1. INTRODUCTION.

Dans ce chapitre, nous présenterons l'organisation ultrastructurale des mycorhizes de catalpa (*Catalpa bignonioides* Walt., BIGNONIACEES) obtenues en conditions contrôlées. Nous rappelons que les plantules de catalpa sont issues de semis et mycorhizées par *Glomus intraradices*. Elles proviennent du laboratoire de Physiopathologie végétale du centre d'Epoisses.

Le système racinaire a été fixé huit semaines après l'infection.

Cette étude va également permettre de comparer, sur cette essence ligneuse, le comportement de *Glomus intraradices*, déjà utilisé comme agent mycorhizogène pour le merisier et le pommier (cf. chapitre I).

#### 2. ETUDES CYTOLOGIQUES EN MICROSCOPIE ELECTRONIQUE.

#### 2.1. LES HYPHES INTERCELLULAIRES.

Les hyphes intercellulaires progressent dans la racine au niveau des méats (Planche 26, figs. 1 et 4). Elles y sont peu nombreuses; seules une ou deux sections d'hyphes sont présentes.

Les hyphes intercellulaires ne sont pas libres dans les méats, mais s'accolent étroitement aux parois des cellules de l'hôte. Les parois fongiques peuvent présenter un épaississement plus ou moins important dans ces zones de contact (Planche 26, figs. 2 et 3).

Le cytoplasme fongique renferme de nombreux grains de glycogène (Planche 26, fig. 1).

#### 2.2. LES STRUCTURES INTRACELLULAIRES.

L'arbuscule s'établit à partir d'une ramification latérale d'une hyphe intercellulaire qui pénètre dans la cellule (Planche 26, fig. 4), et s'y divise de nombreuses fois de façon dichotomique. La matrice de l'interface est occupée par une substance dense qui englobe les vésicules et les tubules des formations plasmalemmiques de l'hôte.

Cette substance est marquée par le test PATAg (Planche 27, figs. 2 et 3) et la coloration des protéines de SWIFT (Planche 27, fig. 4). Elle ne présente pas une répartition homogène; les sections des hyphes sont entourées d'une auréole claire dans laquelle on observe quelques fibrilles glycoprotéiques (Planche 27, figs. 1 à 4).

Compte tenu des importantes rétractions observées le long des parois des cellules-hôtes (Planche 27, fig. 3), nous pensons que cette zone claire est un artéfact créé par la rétraction des structures au cours des manipulations et que, dans réalité, la totalité de la matrice est remplie par cette substance glycoprotéique. L'étirement de sa trame dans la zone de rétraction montre qu'elle est constituée de fibrilles; mais dans la matrice, ces dernières sont groupées de manière tellement dense que la structure fibrillaire n'est plus perceptible.

Par rapport à une cellule sans endophyte où il se limite à un film pariétal (Planche 26, fig. 4), le cytoplasme de l'hôte se développe considérablement (Planche 26, fig. 5) lors de l'établissement de l'arbuscule.

Le fond cytoplasmique des cellules corticales du catalpa est très dense aux électrons (Planche 27, fig. 1) et, hors les plastes et les mitochondries (Planche 28, figs. 3 et 4), il est difficile d'y individualiser des organites.

Les mitochondries sont abondantes et montrent un système de crêtes bien developpé (Planche 28, figs. 3 et 4).

Dans les cellules sans endophyte, l'évolution des plastes aboutit à la formation d'amyloplastes de taille importante (Planche 26, fig. 4).

Dans les cellules corticales renfermant un arbuscule vivant, les plastes présentent des sections ovales ou allongées et sinueuses (Planche 27, figs. 1, 3). Ils ne contiennent jamais d'amidon et leur matrice, très dense, ne permet pas de distinguer leur organisation interne. Ce sont des leucoplastes indifférenciés (Planche 27, figs. 1 à 3).

Lorsque l'arbuscule dégénère, il apparaît dans le stroma plastidial des inclusions fortement réactives au test de mise en évidence des polysaccharides. Ce sont des grains d'amidon en formation (Planche 28, figs. 3 à 5).

Dans les cellules renfermant un arbuscule mort, les plastes sont des amyloplastes (Planche 26, figs. 6 et 7).

La dégénérescence de l'arbuscule commence par les branches les plus fines, puis les grosses branches (Planche 26, fig. 6) et finalement le tronc (Planche 26, fig. 7). Les hyphes se vident de leur contenu cytoplasmique et l'arbuscule effondré n'est plus représenté que par ses parois fongiques agglomérées (Planche 28, figs. 1, 2 et 5).

Le test PATAg (Planche 28, fig. 1) et la réaction de mise en évidence des protéines (Planche 28, fig. 2) montrent la présence de très nombreuses fibrilles réactives entourant cette masse d'hyphes mortes.

Les cellules corticales externes renferment des pelotons qui ne sont pas différents de ceux précédement décrits (cf. chapitres I et II). L'hyphe pénétrante s'enroule dans la cellule, les sections observées sont toutes de même taille. Elles sont doublées d'une couche fibrillaire réactive au test PATAg (Planche 28, fig. 6). L'interface est de type IT 21 (BRACKER et LITTLEFIELD 1973). La formation d'un peloton n'induit pas d'accroissement

notable du cytoplasme de la cellule-hôte.

#### 3. DISCUSSION ET CONCLUSION.

Les racines des plantules de Catalpa bignonioides peuvent s'associer avec une Endogonacée (Glomus intraradices) pour former une endomycorhize V.A. La structure et l'organisation de cette endomycorhize ne présentent pas de différences fondamentales avec ce qui a été décrit dans d'autres espèces ligneuses (KINDEN et BROWN 1975 a, b, c; STRULLU 1978; NAGY et NORDBY 1980; MARX 1981; BONFANTE-FASOLO 1984; KREUTZ-JEANMAIRE 1988 a: BOUDARGA et DEXHEIMER 1988; BOUDARGA 1989).

Comme divers auteurs (SCANNERINI et BONFANTE-FASOLO 1977; STRULLU 1978; KINDEN et BROWN 1975 c; TOTH et MILLER 1984; BONFANTE-FASOLO et FONTANA 1985; DEXHEIMER et al. 1989) l'ont déjà signalé pour d'autres espèces, l'édification d'un arbuscule chez le Catalpa bignonioides induit dans la cellule-hôte des transformations structurales et métaboliques remarquables, qui se traduisent au niveau ultrastructural par l'accroissement du volume volume cytoplasmique, la réduction du vacuolaire, le développement et la multiplication des organites, l'absence d'amidon dans les plastes.

Cependant, à côté de cette organisation d'ensemble identique à ce qui est déjà connu, quelques différences sont néanmoins à signaler:

- Si les plastes n'accumulent jamais d'amidon, nous n'avons pas observé de différenciation en leucoplastes sécréteurs comme chez Prunus avium et Pirus malus (cf. chapitre I), ou en chromoplastes comme chez Ornithogalum umbellatum (SCANNERINI et BONFANTE-FASOLO 1977). Chez le Catalpa bignonioides, les plastes restent indifférenciés et leur stoma souvent très dense ne présente aucune structure.

Ceci a été observé dans d'autres espèces (STRULLU 1978; KINDEN et BROWN 1975 c; DEXHEIMER *et al.* 1990) et interprété comme des plastes dont le développement est bloqué au stade proplaste.

Nous pensons qu'il convient de réserver le terme de proplaste aux plastes des cellules méristématiques, et nous considérons que les plastes des cellules renfermant un arbuscule vivant sont des leucoplastes peu spécialisés.

- Au niveau de l'<u>interface</u>, l'espace matriciel est entièrement <u>occupé par une substance glycoprotéique dense</u>, qui enrobe toutes les hyphes. C'est la couche d'isolement.

Cette couche est souvent séparée du champignon par un espace clair dont la nature artéfactuelle ne fait aucun doute (rétraction). Cependant, sa présence quasi constante et l'absence totale d'arrachement le long du plasmalemme de l'interface peut être interprété de la manière suivante:

La cellule-hôte produit le matériel polysaccharidique de la couche d'isolement, dont la polymérisation se fait au niveau de la membrane périsymbionte. Pour le catalpa, cette synthèse est particulièrement importante.

L'endophyte se nourrit de ces sucres qu'il prélève dans la matrice en bloquant leur polymérisation, ou en lysant les produits déjà assemblés.

Pour notre part, nous pensons que les susbtances actives excrétées par le champignon agissent à proximité immédiate des hyphes, en dépolymérisant les fibrilles polysaccharidiques de la couche d'isolement. Dans cette zone d'activité, la structure de la couche d'isolement est modifiée (sucres dépolymérisés), elle présente une moindre résistance et se rompt au moment des manipulations.

Cette interprétation est confirmée par le fait que, nous n'avons jamais observé de décollement de cette couche autour des restes fongiques (où le champignon n'est plus actif).

Il convient, dans la structure de l'interface, de tenir compte de cette couche d'isolement particulièrement importante. L'interface est de type IT 21 (BRACKER et LITTLEFIELD 1973), elle comprend:

-le plasmalemme du champignon,

-la paroi de l'hyphe,

-une matrice pleine, totalement occupée par la couche d'isolement,

-le plasmalemme de l'hôte qui borde l'interface (membrane périsymbionte).

Ces résultats et notamment l'existence de différences dans l'organisation des mycorhizes sont particulièrement intéréssants, car nous avons utilisé pour cette étude la même espèce et la même souche de champignon mycorhizogène (*Glomus intraradices*) que pour les études sur les mycorhizes des Rosacées ligneuses.

Il est évident que ces différences sont liées à l'hôte et non à l'endophyte. Ce phénomène a été observé dans plusieurs autres couples symbiotiques.

Dans les Rosacées ligneuses, certains endophytes édifient un réseau d'hyphes intercellulaires particulièrement dense, noyé dans un ciment polysaccharidique et évoquant un réseau de Hartig (KREUTZ-JEANMAIRE *et al.* 1986, 1988 b). Les mêmes endophytes, associés à *Allium cepa*, forment un réseau intercellulaire lâche.

Chez Gentiana lutea infecté par Glomus fasciculatum ou Glomus mosseae, JACQUELINET-JEANMOUGIN (1986) a observé que l'endophyte se propage directement de cellule à cellule, sans former de réseau intercellulaire, et que les arbuscules résultent de la ramification des hyphes d'un peloton.

De même chez *Ginkgo biloba*, *Glomus fasciculatum* forme des pelotons et passe directement de cellule à cellule sans réseau d'hyphes intercellulaires.

Par contre, chez *Allium cepa*, ce même endophyte ne forme pas de pelotons et édifie un réseau d'hyphes intercellulaires (BONFANTE-FASOLO et FONTANA 1985).

Pour BONFANTE-FASOLO (1987) des composants pariétaux de l'hôte seraient responsables de ces modulations, et agiraient comme des régulateurs. C'est ainsi que chez *Ginkgo biloba*, un matériel sombre, probablement de nature phénolique, occupe les espaces intercellulaires et bloque le champignon qui ne peut se propager que de cellule à cellule.

Nous pouvons conclure de ces observations, en accord avec BONFANTE-FASOLO (1984) et GIANINAZZI-PEARSON (1985), que l'hôte, dans une certaine mesure, est capable de moduler l'organisation de la mycorhize.

# PHOTOGRAPHIQUES

N° 26 à 28

.

## PLANCHES

Ultrastructure des mycorhizes de Catalpa bignonioides/ Glomus intraradices obtenues en conditions contrôlées.

Test PATAg.

Figure 1: Hyphes intercellulaires. Le cytoplasme fongique renferme des grains de glycogène. La paroi des hyphes présente des épaississements permettant au champignon de se fixer sur la paroi des cellules corticales. (X 15000)

<u>Figures 2 et 3:</u>

Détails de la figure 1 montrant les épaississements de la paroi des hyphes intercellulaires. (X 26000) (X 27500)

Figure 4: Pénétration de l'endophyte dans une cellule-hôte. Les cellules voisines, non infectées, renferment des amyloplastes. (X 3000)

<u>Figure 5:</u>

Cellule contenant un arbuscule vivant. Les nombreuses sections d'hyphes sont noyées dans le cytoplasme de la cellule-hôte. (X 3000)

Figure 6: Arbuscule dégénérescent. Les branches se sont effondrées, seul le tronc ramifié est encore vivant. Noter la présence d'un amyloplaste (flèche). (X 3000)

Figure 7: Zone âgée de la mycorhize. Les cellules de l'hôte renferment des arbuscules morts et des amyloplastes avec de gros grains d'amidon. (X 3000)



Ultrastructure des mycorhizes de Catalpa bignonioides/ Glomus intraradices obtenues en conditions contrôlées.

Acétate d'uranyle - Citrate de plomb: fig. 1. Test PATAg: figs 2 et 3. Réaction de SWIFT: fig. 4.

Figure 1:

De nombreuses fibrilles sont présentes dans la matrice. Le cytoplasme de l'hôte est particulièrement dense. Les plastes sont des proplastes avec un stroma dense et granuleux. Ils peuvent présenter un contour lobé. (X 20500)

Figure 2: Le matériel fibrillaire dans la matrice est marqué par le test de mise en évidence des polysaccharides. Remarquer le décollement (zone claire) au contact de l'endophyte. (X 18000)

Figure 3: Au cours de la fixation, le cytoplasme de l'hôte s'est rétracté, créant un espace périplasmique important le long de la cellule-hôte. (X 17500)

Figure 4: La réaction de SWIFT met en évidence une composante protéique dans le matériel fibrillaire de l'interface. (X 8000)

.



Ultrastructure des mycorhizes de Catalpa bignonioides/ Glomus intraradices obtenues en conditions contrôlées.

Les parois fongiques se sont effondrées et agglomérées en

Les hyphes mortes sont encapsulées dans du matériel

Test PATAg: figs 1, 3, 4, 5 et 6. Réaction de SWIFT: fig. 2.

Figures 1 et 2:

une masse résiduelle.

test PATAg (fig. 1) et la réaction de SWIFT (fig. 2). (X 6000) (X 7200) <u>Figure 3:</u> Détail d'un arbuscule. Le cytoplasme de la cellule-hôte renferme un plaste dont le contour est lobé. Le test PATAg met en évidence dans le stroma plastidial, une zone granuleuse très fortement réactive (flèche). (X 25000)

fibrillaire qui occupe toute la matrice, et qui marqué par le

Figure 4: Détail d'une cellule abritant un arbuscule dégénérescent. Dans le stroma des plastes, on observe la présence de plusieurs inclusions fortement marquées par le test PATAg. Ce sont des grains d'amidon en formation. (X 15000)

Figure 5: L'arbuscule est totalement effondré. Les amyloplastes renferment de gros grains d'amidon marqués par le test de mise en évidence des polysaccharides. (X 10000)

Figure 6: Détail d'un peloton. La paroi de l'hyphe intracellulaire est doublée d'une couche fibrillaire réactive au test PATAg (flèche). (X 7000)



# ETUDE FONCTIONNELLE DES MYCORHIZES A VESICULES ET ARBUSCULES Etudes cytoenzymologiques
Afin d'affiner l'approche fonctionnelle, au niveau ultrastructural, des mycorhizes à vésicules et arbuscules, nous avons essayé de localiser, en continuité avec les travaux déjà réalisés, quelques activités enzymatiques qui semblent jouer un rôle important dans les échanges entre les partenaires de la symbiose.

Nous nous sommes intéressée aux activités nucléosides diphosphatasiques et glucose-6-phosphatasiques dans les mycorhizes d'*Allium cepa*.

Les activités NDPasiques ont été signalées par différents auteurs (POUX 1967; ZAAR et SCHNEPF 1969; DAUWALDER *et al.* 1969, 1972; GOFF 1973; MARUYAMA 1974; DEXHEIMER 1978; DEXHEIMER *et al.* 1982 c) sur les sites de synthèse de matériel polysaccharidique.

Les glucose-6-phosphatases sont des enzymes multifonctionnelles jouant un rôle important dans le transfert du glucose à travers les membranes (ROTHSTEIN 1954; NORDLIE 1971; LEI 1988).

L'étude du fonctionnement au niveau cellulaire des endomycorhizes V.A. passait donc par la localisation de ces activités enzymatiques impliquées dans les transfert de sucres et en particulier de glucose.

Plusieurs critères ont guidé notre choix pour l'utilisation de l'oignon comme plante-hôte. Les mycorhizes à vésicules et arbuscules d'Allium cepa ont fait l'objet de travaux de cytologie ultrastructurale (DEXHEIMER *et al.* 1979), notamment dans les études de localisation d'activités enzymatiques (phosphatases GIANINAZZI *et al*. 1979; phosphatases acides: alcalines: GIANINAZZI-PEARSON et al. 1978; GIANINAZZI et al. 1979; ATPases: MARX 1981). Les techniques de manipulation de ce matériel sont au point et ces mycorhizes constituaient pour nos travaux un matériel de référence bien connu. De plus, il est facile de le cultiver en serre et d'obtenir des mycorhizes; ce qui est particulièrement important lorsqu'il s'agit de disposer d'un matériel abondant pour mettre au point les techniques de cytoenzymologie.

Dans les mycorhizes de merisier, nous avons également recherché les activités phosphatasiques alcalines. Ces dernières ont déjà fait l'objet de travaux (oignon: GIANINAZZI-PEARSON et GIANINAZZI 1978; GIANINAZZI et al. 1979; DEXHEIMER et al. 1982 a et b; Erable: MARX 1981, DEXHEIMER et al. 1982 b; Framboisier: MORANDI 1981, DEXHEIMER et al. 1982 b; Trèfle: PONS 1984; Gentiane: JACQUELINET-JEANMOUGIN 1986; Eucalyptus: BOUDARGA 1989). Il paraissait cependant intéressant de vérifier ces résultats sur le merisier (plante-hôte ligneuse), et de réaliser un parallèle entre les activités phosphatasiques alcalines révélées dans les mycorhizes et dans les hyphes d'un champignon proche des Endogonacées, le *Mucor*.

# CHAPITRE I

# LOCALISATION DES ACTIVITES PHOSPHATASIQUES NEUTRES DANS LES MYCORHIZES D'ALLIUM CEPA

.

106

## LOCALISATION DES ACTIVITES PHOSPHATASIQUES NEUTRES DANS LES MYCORHIZES D'ALLIUM CEPA

#### 1. INTRODUCTION.

Pour mettre en évidence ce type d'activité phosphatasique, nous avons employé trois substrats: l'inosine diphosphate, la thiamine pyrophosphate et le  $\beta$ -glycérophosphate de sodium.

Deux milieux d'incubation ont été utilisés (cf. matériel et méthodes p. 13), celui de NOVIKOFF et GOLDFISHER (1961), très classique, qui fait intervenir le plomb comme agent de capture des phosphatases, et le milieu mis au point pour des cellules animales par ROBINSON et KARNOVSKY (1983 a et b), qui remplace le plomb par du cérium pour précipiter les phosphates. Pour ces auteurs, ce milieu a l'avantage, par rapport au précédent, de donner des images plus fines et d'éliminer une grande partie des précipités non spécifiques.

Les phosphatases neutres ont été recherchées dans les associations symbiotiques *Allium cepa/Glomus intraradices*, *Allium cepa/Glomus fasciculatum*, obtenues en conditions contrôlées selon les modalités exposées précédemment et dans des racines d'*Allium cepa* non infectées, au niveau des zones où se situe habituellement la mycorhize et dans les cellules proches du méristème apical.

#### 2. RESULTATS.

Avec les deux associations mycorhiziennes et les deux milieux utilisés, les résultats sont sensiblement identiques. Avec le milieu de ROBINSON et KARNOVSKY, le marquage est beaucoup plus fin et les images obtenues sont quasiment exemptes de précipités non spécifiques (Planche 29, figs. 2 et 5; Planche 32, figs. 2 et 4). Toutefois, les structures, comme le réticulum endoplasmique de la cellule-hôte, qui présentent un faible marquage avec le milieu de NOVIKOFF et GOLDFISHER (Planche 32, fig. 3), sont peu ou pas marquées avec le milieu au cérium (Planche 32, fig. 4).

Dans une cellule de mycorhize abritant un arbuscule vivant, ces activités phosphatasiques neutres sont mises en évidence au niveau de l'interface: le long du plasmalemme de l'hôte, sur le plasmalemme du champignon et à la surface des hyphes (Planche 29, figs. 1 à 5; Planche 30, fig. 1; Planche 31, figs. 1, 3, 5 et 6). Des précipités de phosphate de plomb sont également présents sur le tonoplaste de l'hôte (Planche 29, figs. 1, 3, 4). Dans le cytoplasme de la cellule-hôte, en utilisant la thiamine pyrophosphate comme substrat, une faible réaction est observée dans les travées du réticulum endoplasmique et le long du tonoplaste (Planche 31, figs. 5 et 6).

Suivant le substrat employé l'intensité de la réaction varie. Elle est plus discrète avec le  $\beta$ -glycérophosphate de sodium (Planche 31, figs. 1 et 3) qu'avec les deux autres substrats. Avec la thiamine pyrophosphate (Planche 31, figs. 5 et 6) les précipités sont parfois si denses qu'ils remplissent toute la lumière de la matrice.

Le plasmalemme périphérique de la cellule-hôte présente une activité très faible (Planche 29, fig. 1) ou nulle (Planche 29, fig. 3), ce qui contraste fortement avec celle très intense de la membrane périsymbionte (Planche 29, figs. 1 à 5). Cette dernière, très réactive autour des petites branches de l'arbuscule, est marquée par une ligne continue et épaisse de précipités localisés sur sa face externe (Planche 29, figs. 1, 2, 4; Planche 30, fig. 1; Planche 31, figs. 1, 3, 5 et 6)). Les vésicules et formations membranaires diverses, bourgeonnées par le plasmalemme de l'hôte sont aussi fortement réactives (Planche 30, fig. 3).

Les précipités présentent la même localisation que les fibrilles polysaccharidiques de la couche d'isolement. Entre les précipités superficiels et le plasmalemme fongique réactif, la paroi des hyphes apparaît claire aux électrons (Planche 29, fig. 4; Planche 31, figs. 5 et 6).

Lorsque l'arbuscule est mort, le plasmalemme qui entoure les restes agglomérés est toujours très réactif (Planche 30, figs. 4 et 5; Planche 31, figs. 2 et 4). Nous avons aussi mis en évidence une activité à la surface des hyphes vivantes ou effondrées de l'arbuscule (Planche 30, fig. 5; Planche 31, figs. 2 et 4).

Nous avons également recherché ces activités **dans les** cellules corticales différenciées de racines d'oignon sans mycorhize, aux niveaux correspondants aux zones habituellement infectées (Planche 32, figs. 3 à 6).

Ces cellules renferment une volumineuse vacuole centrale et le cytoplasme est réduit à une mince pellicule pariétale. Les activités phosphatasiques neutres sont décelées le long du tonoplaste (Planche 32, figs. 3, 4 et 5) et dans les travées du réticulum endoplasmique (Planche 32, figs. 3, 5 et 6). Ces sites d'activité sont également observés dans les cellules renfermant l'endophyte. En utilisant la thiamine pyrophosphate comme substrat, il a également été mis en évidence une activité sur la membrane nucléaire (Planche 32, fig. 6).

Le plasmalemme qui borde la cellule est inactif (Planche 32, figs.  $3 \ge 6$ ).

Dans les zones proches du méristème apical où les cellules racinaires sont en cours de différenciation, une activité phosphatasique neutre est observée sur le plasmalemme (Planche 32, figs. 1 et 2). On note également la présence de précipités dans les parois (Planche 32, figs. 1 et 2).

Afin de contrôler la spécificité de la réaction et d'éliminer d'éventuelles interférences avec les ATPases, nous avons réalisé des incubations en présence de diéthylstilbestrol (D.E.S.). L'activité révélée avec l'inosine diphosphate comme substrat n'est pas inhibée (Planche 30, fig. 2).

Le **témoin** réalisé en incubant les objets en l'absence de substrat ne montre aucun précipité visible (Planche 30, fig. 6).

#### 3. DISCUSSION ET CONCLUSION.

Notre attention sera plus particulièrement retenue par trois points: la nature des activités enzymatiques mises en évidence, la signification de leur localisation et leur rôle possible dans la symbiose mycorhizienne.

## <u>3.1. La nature des activités enzymatiques mises</u> <u>en évidence.</u>

Pour mettre en évidence ces activités phosphatasiques neutres nuos avons employé trois substrats différents: l'inosine diphosphate (IDP), la thiamine pyrophosphate (TPP) et le  $\beta$ -glycérophosphate de sodium.

Dans les deux associations mycorhiziennes, avec les trois substrats, la localisation des activités phosphatasiques neutres au niveau de l'interface est à quelques détails près identique. Seule l'intensité de la réaction varie. Elle est plus discrète avec le ß-glycérophosphate qu'avec les deux autres substrats.

Si la plupart de ces auteurs sont d'accord pour admettre qu'en utilisant l'IDP comme substrat, il est mis en évidence des activités nucléosides diphosphatases (NDPases), la situation est moins claire en ce qui concerne la TPP.

Pour certains auteurs il s'agit de la même activité enzymatique (NDPase) révélée par les deux substrats (GIRAUD 1968; YAMAZAKI et HAYAISHI 1968); pour d'autres, les activités NDPasiques et TPPasiques sont bien distinctes et les études cytochimiques semblent confirmer ce point de vue (ALLEN 1963 a et b; GOLDFISCHER *et al.* 1971; MARUYAMA 1974). Le  $\beta$ -glycérophosphate de Na n'est pas un substrat très spécifique puisqu'il est utilisé à d'autres pH, pour la mise en évidence des activités phosphatasiques alcalines (pH 8,5) et phosphatasiques acides (pH 5).

Il ne nous est donc pas possible de conclure à l'existence d'activités enzymatiques différentes, présentant la même localisation, ou à la manifestation d'une plus ou moins grande affinité d'une même enzyme pour des substrats différents.

Avec les deux milieux utilisés les résultats sont sensiblement identiques. Avec le milieu de ROBINSON et KARNOVSKY, le marquage est plus discret, et parfois il ne permet pas de révéler les structures peu réactives comme le réticulum endoplasmique.

Toutefois, comme pour les cellules animales, le milieu de ROBINSON et KARNOVSKY apparaît tout à fait valable pour révéler la présence d'activités phosphatasiques neutres dans les cellules végétales.

# 3.2. La signification de la localisation de ces activités.

Les auteurs qui ont étudié les activités phosphatasiques neutres (POUX 1967; DAUWALDER et *al.* 1969, 1972; ZAAR et SCHNEPF 1969; GOFF 1973; MARUYAMA 1974; ZERBAN et WERZ 1975; DEXHEIMER 1978; DEXHEIMER *et al.* 1982 c) les ont localisées au niveau des dictyosomes dans les travées du réticulum endoplasmique, sur le tonoplaste, le long du plasmalemme, dans les parois cellulaires et parfois sur la membrane nucléaire.

Dans notre matériel, suivant son âge et son état de mycorhization, nous avons retrouvé ces sites d'activités ou seulement quelques-uns d'entre eux.

De nombreux auteurs ont remarqué, aussi bien dans les cellules animales que végétales, que ces activités phosphatasiques neutres sont souvent mises en évidence sur les sites de synthèse polysaccharidique (POUX 1967; ZAAR et SCHNEPF 1969; DAUWALDER *et al.* 1969, 1972; GOFF 1973; MARUYAMA 1974; DEXHEIMER 1978; DEXHEIMER *et al.* 1982 c). La liaison entre les deux est si constante, que GOFF (1973) suggère que ces activités enzymatiques pourraient servir de marqueur pour les sites de synthèse polysaccharidique et de glycosylation.

Dans les cellules en différentiation (cellules proches du méristème apical) des racines d'oignon sans mycorhize, nous avons mis en évidence des activités phosphatasiques neutres sur le plasmalemme et dans les parois en élongation, donc là où sont localisées d'importantes synthèses de matériaux polysaccharidiques. Nous considérons que, dans notre matériel, ces activités enzymatiques sont également des marqueurs des sites de glycosylation, de synthèse et de transport des polysaccharides (JEANMAIRE *et al.* 1985; KREUTZ-JEANMAIRE *et al.* 1988 b).

Dans les cellules corticales différenciées des racines non mycorhizées, au niveau des zones habituellement infectées, les activités phosphatasiques neutres sont décelées le long du tonoplaste et dans les travées réticulaires.

Ces sites d'activité sont aussi observés dans les cellules abritant un endophyte. Dans ces dernières, nous avons observé de manière constante la présence d'une activité à la surface des hyphes vivantes ou effondrées de l'arbuscule. Divers travaux ont décrit la présence de nombreuses fibrilles sur le plasmalemme de l'hôte qui borde l'interface (DEXHEIMER *et al.* 1979; SCANNERINI et BONFANTE-FASOLO 1979; BONFANTE-FASOLO *et al.* 1981; MARX 1981). De telles images sont interprétées comme l'image de la polymérisation des précurseurs pariétaux sous l'action des enzymes incluses dans la membrane plasmalemmique de l'hôte (DEXHEIMER *et al.* 1986; KREUTZ-JEANMAIRE *et al.* 1988 b). Les précipités de phosphate de plomb ou de chlorure de cérium occupent la même place que les fibrilles de la couche d'isolement ou d'encapsulement.

Dans une cellule infectée, le plasmalemme qui borde la paroi cellulaire est peu ou pas marqué, par contre le plasmalemme qui entoure les branches arbusculaires présente une forte activité phosphatasique neutre. Ce dernier présente donc des caractères de plasmalemme de cellule juvénile.

## <u>3.3. Rôle possible de ces activités phosphatasiques</u> neutres dans la symbiose.

La comparaison avec des cellules sans endophyte montre que l'envahissement de la cellule-hôte par le champignon mycorhizien provoque un important remaniement métabolique, se traduisant par un accroissement du volume cytoplasmique (cf. lère partie, Chap. 1), un développement des surfaces plasmalemmiques et la présence d'activités enzymatiques existant au stade juvénile.

L'hôte réagit à l'invasion de ses cellules par l'endophyte, en déposant autour de celui-ci du matériel polysaccharidique qui va former la couche d'isolement puis, d'encapsulement des arbuscules morts. Ce matériel polysaccharidique est polymérisé par le plasmalemme de l'hôte, il n'est donc pas étonnant de mettre en évidence sur cette membrane des activités enzymatiques présentant une liaison avec les sites de synthèse polysaccharidiques.

Les précurseurs polysaccharidiques sont vraisemblablement transférés du cytoplasme de l'hôte vers les sites de polymérisation par l'intermédiaire du réticulum endoplasmique. Ce dernier bien développé autour des branches arbusculaires présente des contacts avec la membrane périsymbionte (DEXHEIMER *et al.* 1986; KREUTZ-JEANMAIRE *et al.* 1988 a et b). Pour l'association *Prunus avium/Glomus intraradices* (cf. lère partie, Chapitre 1), dans les travées réticulaires au niveau d'un contact, il a été mis en évidence la présence de matériel polysaccharidique avec l'image d'un passage de ce dernier dans la matrice (cf. Planche 9, fig. 2. De plus, pour au moins un des substrats utilisés, une activité phosphatasique neutre est décelable dans les travées du réticulum endoplasmique.

Une activité phosphatasique neutre est présente sur la membrane périsymbionte autour des petites branches, où la couche d'isolement est souvent réduite à un halo lâche de fibrilles. La active des hyphes de l'endophyte entraîne croissance un accroissement rapide du plasmalemme de l'hôte, ce qui perturbe le processus de dépôt de la couche d'isolement (GIANINAZZI et al. 1983; JEANMAIRE et al. 1985). De plus, le champignon possède un équipement enzymatique capable de bloquer la polymérisation ou de dépolymériser les matériaux pariétaux qui se déposent au niveau de l'interface. Pendant toute la phase où il est actif, il retarderait ou empêcherait la mise en place de cette couche, bien que ces éléments constitutifs soient produits en permanence par le plasmalemme. Les sucres accumulés dans la matrice sont alors absorbés par l'endophyte.

Le plasmalemme fongique présente également une activité phosphatasique neutre. Elle ne semble pas avoir la même signification que celle du plasmalemme de l'hôte. Les modifications morphologiques de la paroi fongique sont peu importantes, surtout au niveau des grosses branches de l'arbuscule, et ne peuvent rendre compte d'une telle activité.

Le passage des sucres de la matrice vers l'endophyte à travers le plasmalemme fongique mettrait en jeu des phénomènes de phosphorylation (WOOLHOUSE 1975; KREUTZ-JEANMAIRE 1988 b). Les activités phosphatasiques fongiques pourraient être les marqueurs de ces phénomènes (DEXHEIMER *et al.* 1986; KREUTZ-JEANMAIRE *et al.* 1988 b).

# PHOTOGRAPHIQUES

N° 29 à 32

Ultrastructure des mycorhizes d'Allium cepa / Glomus intraradices (figs. 1, 3, 4) et Allium cepa / Glomus fasciculatum (figs. 2 et 5).

Mise en évidence des phosphatases neutres avec l'inosine diphosphate comme substrat.

Milieu de NOVIKOFF et GOLDFISHER: figs. 1, 3 et 4. Milieu de ROBINSON et KARNOVSKY: figs. 2 et 5.

Contrastant: acétate d'uranyle.

Figure 1:

Le plasmalemme périsymbiotique est souligné par des précipités de phosphate de plomb. Au contraire, le plasmalemme de la cellule-hôte qui borde le cytoplasme (flèche en haut) est très faiblement réactif.

(X 22000)

#### Figure 2:

Avec le milieu de ROBINSON et KARNOVSKY, qui utilise le cérium comme agent de capture, nous avons obtenu les mêmes résultats qu'avec le milieu de NOVIKOFF et GOLDFISHER, mais la réaction est moins intense.

(X 29000)

#### Figure 3:

Le cliché représente une partie de la cellule-hôte avec, à gauche la surface cellulaire, à droite la vacuole et, en haut à gauche la section d'une fine branche. Le cytoplasme est réduit à une mince pellicule entre la paroi et la vacuole. Le tonoplasme présente des précipités de plomb alors que le plasmalemme périphérique qui est très proche ne laisse voir aucune activité (flèches).

(X 16000)

Figures 4 et 5:

Détails de l'interface au niveau des fines branches de l'arbuscule.

Le plasmalemme fongique et la membrane périsymbionte sont très marqués (flèches).

Le tonoplaste de la vacuole de la cellule-hôte porte des précipités parfois importants. Les vacuoles de l'endophyte ne montrent aucune réaction.

Remarquer les précipités fixés sur la surface externe des hyphes et les précipités diffus dans la matrice.

(X 30000) (X 17500)



Ultrastructure des mycorhizes d'Allium cepa / Glomus intraradices. Mise en évidence des phosphatases neutres avec l'inosine diphosphate comme substrat. Milieu de NOVIKOFF et GOLDFISHER. Contrastant: acétate d'uranyle. <u>Figure 1:</u> Le plasmalemme de l'hôte qui borde l'interface est très réactif (flèches). Il porte de gros précipités floconneux. Certains se sont détachés dans la matrice. (X 17000) Figure 2:

Afin de contrôler la spécificité de la réaction et d'éliminer d'éventuelles interférences avec les ATPases, nous avons réalisé des incubations en présence de diéthylstilbestrol (D.E.S.).

L'activité révélée avec l'IDP comme substrat n'est pas inhibée.

(X 31500)

<u>Figure 3:</u> Réactivité des vésicules plasmalemmiques de l'hôte contenues dans l'interface. (X 78000)

Figures 4 et 5: L'activité persiste quel que soit le stade d'évolution de l'arbuscule. Le plasmalemme qui entoure les restes agglomérés est toujours très réactif (flèche). En 4, une grosse branche effondrée réduite à sa paroi; elle est doublée d'une épaisse couche de phosphate de plomb. En 5, ensemble de branches effondrées, le matériel d'encapsulement montre un marquage très net. (X 34000) (X 15000)

<u>Figure 6:</u> Témoin réalisé en incubant les objets en l'absence de substrat. Aucun précipité n'est visible. (X 36500)



Ultrastructure des mycorhizes d'Allium cepa / Glomus intraradices.

Mise en évidence des phosphatases neutres avec le  $\beta$ -glycérophosphate de sodium (figs. 1 à 3) et la thiamine pyrophosphate (figs. 4 à 6) comme substrat.

Milieu de NOVIKOFF et GOLDFISHER. Contrastant: acétate d'uranyle.

Figures 1 à 3:

Avec le <sup>β</sup>-glycérophosphate de sodium comme substrat, la localisation de précipités de phosphate de plomb est indentique, mais la réaction est moins intense qu'avec l'inosine diphosphate.

La membrane périsymbionte et le plasmalemme fongique sont marqués (figs. 1 et 3). Le tonoplate de l'hôte présente quelques précipités (flèches).

Lorsque l'arbuscule est mort (fig. 2), l'activité persiste sur le plasmalemme de l'hôte ainsi que dans le matériel d'encapsulement.

(X 48000) (X 25000) (X 34000)

Figures 4 à 6:

Avec la thiamine pyrophosphate comme substrat, nous obtenons une localisation identique à celle observée pour les deux autres substrats.

Cependant la réaction est plus intense. Les précipités sont parfois si denses que toute la lumière de la matrice en est obturée (fig. 5).

Le réticulum endoplasmique de la cellule-hôte montre une très faible activité.

(X 35000) (X 36000) (X 34500)



Ultrastructure des cellules corticales non différenciées (figs. 1 et 2) et différenciées (figs. 3 à 6) de racines d'*Allium cepa* non infectées.

Mise en évidence des phosphatases neutres en utilisant soit l'inosine diphosphate (figs. 1 à 4) soit la thiamine pyrophosphate (figs. 5 et 6) comme substrat.

Milieu de NOVIKOFF et GOLDFISHER: figs. 1, 3, 5 et 6. Milieu de ROBINSON et KARNOVSKY: figs.: 2 et 4. Contrastant: acétate d'uranyle.

#### Figure 1:

Dans les cellules de l'hôte non infectées, p méristème apical donc peu différenciées, les proches du activités phosphatasiques neutres sont révélées le long du plasmalemme et dans les parois cellulaires (flèches).

(X 11500)

Figure 2:

Avec le milieu de ROBINSON et KARNOVSKY, la localisation des précipités est identique (flèches) mais l'intensité de la réaction est plus faible. (X 15500)

#### Figure 3:

Dans les cellules différenciées d'Allium cepa sans endophyte, mais au niveau des zones habituellement infectées, l'essentiel de l'activité phosphatasique neutre est observé sur le tonoplaste. Une faible activité est décelée dans les travées du réticulum endoplasmique.

(X 25000)

Figure 4: Avec la technique au cérium, l'activité phosphatasique neutre n'est présente que sur le tonoplaste. (X 28000)

Figures 5 et 6:

Avec la TPP comme substrat, l'activité enzymatique est décelée sur le tonoplaste, dans les travées du réticulum endoplasmique et sur la membrane nucléaire (fig. 6). Le marquage dans travées du réticulum endoplasmique est plus intense qu'avec l'inosine diphosphate comme substrat. (X 27000) (X 33000)



# CHAPITRE II

.

# LOCALISATION DE L'ACTIVITE GLUCOSE-6-PHOSPHATASIQUE DANS LES MYCORHIZES D'ALLIUM CEPA

# LOCALISATION DE L'ACTIVITE GLUCOSE-6-PHOSPHATASIQUE DANS LES MYCORHIZES D'ALLIUM CEPA.

#### 1. INTRODUCTION.

L'activité glucose-6-phosphatasique a été recherchée dans les associations mycorhiziennes *Allium cepa / Glomus intraradices* et *Allium cepa / Glomus mosseae*.

Deux milieux d'incubation différents ont été employés: le milieu classique qui utilise le plomb comme agent de capture et le milieu au cérium mis au point par ROBINSON et KARNOVSKY (1983) (cf. chapitre matériel et méthodes).

#### 2. RESULTATS.

Le plasmalemme fongique des branches arbusculaires présente une activité glucose-6-phosphatasique importante (Planche 33, figs. 3 et 4; Planche 34, figs. 1, 2 et 3), par contre les plasmalemmasomes sont peu ou pas réactifs (Planche 33, fig. 3).

Le plasmalemme fongique est également nettement marqué dans les hyphes intercellulaires (Planche 33, figs. 1 et 2; Planche 34, fig. 1).

Avec le milieu "classique", **la membrane périsymbionte** qui entoure les branches de l'arbuscule manifeste une activité glucose-6-phosphatasique réduite ou nulle (Planche 33, fig. 3). Ce n'est qu'au niveau du tronc, que l'on met en évidence une activité glucose-6-phosphatasique sur cette membrane (Planche 33, figs. 5 et 6).

La couche d'isolement est fortement réactive autour des grosses branches (Planche 33, fig. 4) et du tronc de l'arbuscule (Planche 33, figs. 5 et 6).

Avec le milieu au cérium, **la membrane périsymbionte** est nettement réactive (Planche 34, figs. 1 à 3) même autour des branches les plus fines.

Le plasmalemme qui borde la cellule est peu (Planche 34, fig. 1) ou pas réactif (Planche 33, fig.2).

Le tonoplaste des cellules de l'hôte est bordé de quelques précipités (Planche 33, figs 2 et 3; Planche 34, fig. 1). Lorsque l'arbuscule est mort, une activité est décelée le long des restes de la paroi fongique (Planche 33, fig. 7; Planche 34, fig. 4).

Les **témoins** ne montrent aucune activité (Planche 34, figs. 5 et 6).

#### 3. DISCUSSION ET CONCLUSION.

L'essentiel de l'activité glucose-6-phosphatasique des mycorhizes se trouve, comme dans le cas des activités NDPasiques précédemment étudiées, au niveau de l'interface entre les branches arbusculaires et la cellule-hôte.

Afin de contrôler la spécificité de la réaction, nous avons utilisé deux types de témoin.

La glucose-6-phosphatase est une enzyme très thermolabile, aussi nous avons réalisé un premier témoin en chauffant les objets dans la solution d'incubation.

Un second témoin a été réalisé en introduisant un excès de glucose dans le milieu (5%). On réalise ainsi (ARION et NORDLIE 1964), une inhibition de la glucose-6-phosphatase. Les résultats négatifs obtenus, en incubant dans ce milieu, confirment bien la nature de l'activité enzymatique mise en évidence.

Le marquage important du **plasmalemme fongique** dans les branches de l'arbuscule et dans les hyphes intercellulaires, indique l'existence à ce niveau d'une forte activité glucose-6-phosphatasique.

Avec le milieu classique, la membrane périsymbionte est peu marquée autour des branches mais très réactive autour du tronc de l'arbuscule; par contre, avec le milieu de ROBINSON et KARNOVSKY, les précipités de phosphate de cérium sont abondants même autour des branches les plus fines.

ROBINSON et KARNOVSKY (1983), se sont intéréssés à la localisation de cette enzyme dans des cellules animales. Ces auteurs signalent que l'intensité de la réaction en employant le cérium comme agent de capture est plus importante qu'en utilisant le plomb; de même ils observent l'apparition de précipités non spécifiques avec le plomb mais pas avec le cérium.

Dans les mycorhizes d'*Allium cepa*, nous obtenons également une réactivité plus forte de la membrane périsymbionte avec le milieu au cérium. Ce milieu, d'après ces auteurs, n'induit pas de formation de précipités non spécifiques.

Il faut cependant rappeler que nous avons utilisé deux

associations symbiotiques, Allium cepa / Glomus intraradices et Allium cepa / Glomus mosseae, pour mettre en évidence les activités phosphatasiques neutres. Les variations observées avec les deux milieux d'incubation pourraient être dues à l'emploi d'endophytes différents, ou encore dues à un état physiologique différent de la mycorhize au moment de la fixation.

Les glucose-6-phosphatases sont des enzymes multifonctionnelles qui peuvent se comporter:

- soit comme des phosphohydrolases capables d'hydrolyser le glucose-6-phosphate en glucose et en phosphate,

- soit comme des phosphotransférases, catalysant la transphosphorylation en formant du glucose-6-phosphate (NORDLIE 1971). Ces enzymes jouent un rôle important dans le transfert du glucose à travers les membranes (NORDLIE 1971; ROTHSTEIN 1954; LEI 1988).

L'interface de la mycorhize est le siège d'un double flux d'échanges: du phosphore est transféré du champignon vers la cellule-hôte et des sucres de la cellule-hôte vers le champignon.

Dans les ectomycorhizes, LEI (1988) met en évidence une forte activité glucose-6-phosphatasique au niveau du plasmalemme fongique dans les hyphes du réseau de Hartig et sur le plasmalemme des cellules corticales vivantes adjacentes. Cet auteur en conclut que la majeure partie du transfert de glucose se passe à ce niveau; et il propose un schéma de fonctionnement:

- les glucides franchissent passivement le plasmalemme de l'hôte, mais avec l'intervention d'un catalyseur. Ce serait la glucose-6-phosphatase qui jouerait ce rôle en hydolysant le glucose-6-phosphate, permettant ainsi la diffusion du glucose.

- le transport du glucose à travers le plasmalemme fongique met en jeu une phosphorylation, avec intervention des ATPases, localisées d'ailleurs sur ces mêmes sites.

Nous pensons que le même schéma fonctionnel peut s'appliquer aux mycorhizes à vésicules et arbuscules, où des sites de transfert de sucres se situent au niveau de l'interface entre la cellule-hôte et les branches arbusculaires. Il n'est donc pas étonnant de révéler, à ce niveau, une activité glucose-6-phosphatasique.

La cellule réagit à la pénétration du champignon et tente de bloquer son avance en édifiant autour de lui une barrière pariétale, la couche d'isolement. Nous avons mis en évidence, le long de la membrane périsymbionte, des enzymes (phosphatases neutres) qui sont des marqueurs des sites de synthèse et de transport des polysaccharides.

Une activité glucose-6-phosphatasique est présente sur la membrane périsymbionte; cette enzyme pourrait catalyser le passage de glucose-6-phosphate vers la matrice, avec production de glucose et de phosphate.

Le glucose qui est passé dans la matrice, entre dans la composition des fibrilles polysaccharidiques de la couche d'isolement. Le champignon réagit en dépolymérisant ou en bloquant la polymérisation de ces sucres qui diffusent dans la matrice sous forme soluble.

Ces sucres sont phosphorylés et traversent le plasmalemme fongique, d'où la présence à ce niveau d'une importante activité glucose-6-phosphatasique. L'absorption de glucose est couplée à l'hydrolyse des polyphosphates (WOOLHOUSE 1975).

Une activité glucose-6-phosphatasique est également présente sur le plasmalemme des hyphes intercellulaires.

LEI (1988) observe une localisation similaire dans les ectomycorhizes, sur le plasmalemme des hyphes du réseau de Hartig en contact avec les cellules de l'hôte. Cet auteur interprète ce résultat comme indiquant que la majeure partie du transfert de glucose se passe à ce niveau.

Dans les mycorhizes à vésicules et arbuscules, des activités ATPasiques ont également été signalées sur le plasmalemme des hyphes intercellulaires.

La présence d'une activité glucose-6-phosphatasique sur le plasmalemme fongique, pourrait indiquer l'existence d'échanges actifs entre les hyphes intercellulaires et les cellules corticales de l'hôte.

# PHOTOGRAPHIQUES N° 33 à 34

# PLANCHES

123

Ultrastructure des mycorhizes d'Allium cepa/Glomus intraradices. Mise en évidence de la glucose-6-phosphatase. Milieu "classique" faisant intervenir le plomb commme agent de capture. Contrastant: acétate d'uranyle. Figure 1: Le plasmalemme de l'hyphe intercellulaire est très réactif. (X 14000) Figure 2: Le plasmalemme qui borde le cytoplasme de la cellule-hôte ne manifeste aucune activité (flèche). (X 21500) Figure 3: Fine branche de l'arbuscule. Une forte activité est le plasmalemme de l'endophyte. localisée sur Les plasmalemmasomes sont peu réactifs. Le tonoplaste de l'hôte présente quelques précipités de phosphate de plomb. (X 61500) Figure 4: Grosse branche de l'arbuscule. Le plasmalemme fongique est. souligné d'une ligne continue de précipités. La couche d'isolement est également marquée. (X 34000) Figures 5 et 6: Tronc de l'arbuscule. L'activité est localisée non seulement sur le plasmalemme fongique mais aussi sur le plasmalemme de l'hôte. En 7: détail montrant la réactivité des deux plasmalemmes. (X 9000) (X 22000) Figure 7: Arbuscule mort. Des précipités de phosphate de plomb sont présents le long des restes fongiques. Noter l'absence d'activité sur le plasmalemme de l'hôte. (X 18000)



Ultrastructure des mycorhizes d'Allium cepa/Glomus mosseae (figs. 1 à 4) et d'Allium cepa/Glomus intraradices (figs. 5 et 6).

Mise en évidence de la glucose-6-phosphatase.

Milieu de ROBINSON et KARNOVSKY (figs. 1 à 4), milieu "classique" (figs. 5 et 6).

Contrastant: acétate d'uranyle.

Figure 1:

Vue d'ensemble d'une cellule renfermant un arbuscule. Les précipités de phosphate de cérium sont localisés sur les plasmalemmes de l'hôte et du champignon.

Le tonoplate de l'hôte est peu réactif.

Une faible activité est présente sur le plasmalemme de l'hyphe intercellulaire.

(X 11000)

Figures 2 et 3:

Le milieu au cérium révèle une forte activité glucose-6-phosphatasique sur la membrane périsymbionte. Le plasmalemme fongique apparaît également nettement réactif.

(X 40500) (X 47000)

Figure 4:

Arbuscule mort.

Avec le milieu au cérium, des précipités de phosphate de cérium sont localisés sur les branches arbusculaires effondrées. Le tonoplaste de l'hôte est réactif, par contre le plasmalemme de l'hôte qui lui est accolé ne manifeste aucune activité (flèche).

(X 7500)

#### Figure 5:

Témoin réalisé en introduisant un excès de glucose dans le milieu d'incubation.

Aucun précipité n'est visible au niveau de l'interface. (X 45000)

Figure 6:

Témoin réalisé en chauffant les échantillons dans le milieu d'incubation.

Aucune activité glucose-6-phosphatasique n'est décelée. (X 50000)



# CHAPITRE III

# LOCALISATION DES ACTIVITES PHOSPHATASIQUES ALCALINES DANS LES MYCORHIZES DE MERISIER

.

## LOCALISATION DES ACTIVITES PHOSPHATASIQUES ALCALINES DANS LES MYCORHIZES DE MERISIER.

#### 1. INTRODUCTION.

Toutes les études consacrées à la localisation des activités phosphatasiques alcalines dans les mycorhizes VA ont montré que ces activités sont essentiellement localisées sur le tonoplaste des vacuoles fongiques (GIANINAZZI-PEARSON *et al.* 1978 a; GIANINAZZI *et al.* 1979; MARX 1981; MORANDI 1981; DEXHEIMER *et al.* 1982 a et b; PONS 1984; KREUTZ-JEANMAIRE *et al.* 1988 b; BOUDARGA 1989).

Ces résultats, obtenus initialement avec une plante-hôte herbacée (*Allium cepa*), ont ensuite été retrouvés dans quelques plantes-hôtes ligneuses (Erable: MARX 1981, DEXHEIMER *et al.* 1982 b, Framboisier: MORANDI 1981, DEXHEIMER *et al.* 1982 b; Eucalyptus: BOUDARGA 1989).

Le but de notre travail était de vérifier ces résultats dans les associations *Prunus avium / Glomus mosseae* et *Prunus avium / Glomus intraradices*.

#### 2. RESULTATS.

**\*** Dans les mycorhizes de merisier infecté par Glomus intraradices ou Glomus mosseae, les activités phosphatasiques alcalines sont présentes dans les vacuoles fongiques des hyphes intercellulaires (Planche 35, fig. 1) et arbusculaires (Planche 35, figs. 2 à 5).

Ces activités sont peu marquées dans les jeunes hyphes renfermant un cytoplasme riche en organites et peu vacuolisées (Planche 35, figs. 4 et 5). Par contre, elles deviennent particulièrement importantes dans le tronc et les grosses branches très vacuolisées (Planche 35, fig. 2 à 4), où elles peuvent être présentes dans la quasi totalité des vacuoles (Planche 35, figs. 3 et 4).

Lorsque l'arbuscule est mort, l'activité phosphatasique alcaline a disparu (Planche 35, fig. 6).

Des **témoins** ont été réalisés en ajoutant du cyanure de potassium au milieu d'incubation. Dans les objets ainsi traités nous n'observons aucun précipité de phosphate de plomb (Planche 36, fig. 6). \* Les vacuoles sont connues pour avoir un pH acide (KURKDKIAN et al. 1989; ANTOINE et al. 1990), on pourrait donc s'attendre à y révéler une activité phosphatasique acide. Or ce sont des activités alcalines que nous avons mis en évidence, après d'autres auteurs (GIANINAZZI-PEARSON et al. 1978; GIANINAZZI et al. 1979; MARX 1981; MORANDI 1981; DEXHEIMER et al. 1982 a et b; PONS 1984; KREUTZ-JEANMAIRE et al. 1988 b; BOUDARGA 1989), dans les vacuoles fongiques des champignons endomycorhiziens associés à Prunus avium.

Il nous est donc apparu comme intéressant, dans un but de contrôle, de rechercher la localisation de ces activités dans un champignon Phycomycète, proche des Endogonacées, mais présentant un mode de vie tout à fait différent. Notre choix s'est porté sur *le Mucor*.

Dans les **hyphes du** *Mucor*, les activités phosphatasiques alcalines sont localisées sur le tonoplaste des vacuoles (Planche 36, figs. 1 à 4).

Dans les sections d'hyphes renfermant un cytoplasme juvénile, peu vacuolisé (Planche 36, figs. 1 et 3), une seule vacuole présente une activité phosphatasique alcaline localisée le long du tonoplaste.

Dans les hyphes plus âgées fortement vacuolisées (Planche 36, figs. 2 et 4), les activités phosphatasiques alcalines sont également présentes sur le tonoplaste. Cependant, toutes les vacuoles ne réagissent pas de la même façon, certaines sont fortement réactives alors que d'autres, parfois contigües et présentant la même morphologie, ne montrent aucune réaction (Planche 36, figs. 2 et 4).

Les précipités obtenus en utilisant le cérium (Planche 36, figs. 3 et 4) comme agent de capture sont plus fins qu'avec le milieu utilisant le plomb (Planche 36, figs. 1 et 2); mais la réaction est plus importante avec le milieu au cérium et notamment dans les hyphes matures où la localisation tonoplastique apparaît moins clairement.

Ces activités phosphatasiques alcalines sont inhibées par le cyanure de potassium; aucune activité n'est décelée dans le témoin (Planche 36, fig. 5).

#### 3. DISCUSSION ET CONCLUSION.

Dans les hyphes du *Mucor* comme dans celles de *Glomus mosseae* ou *Glomus intraradices* associés au merisier, les phosphatases alcalines sont localisées sur le tonoplaste des vacuoles fongiques.

Cependant toutes les vacuoles ne réagissent pas de la même façon, ceci est particulièrement visible pour le *Mucor*, où l'on peut avoir côte à côte des vacuoles présentant des précipités de phosphate de plomb ou de cérium et d'autres non réactives. Il semble qu'il y ait donc deux catégories de vacuoles, dont une avec des activités phosphatasiques alcalines sur le tonoplaste. Dans les champignons des mycorhizes V.A., cette dernière catégorie serait dominante.

L'activité phosphatasique alcaline est maximale dans les hyphes intercellulaires et arbusculaires (GIANINAZZI *et al.* 1979; STRULLU 1985).

Au niveau des branches de l'arbuscule, elle varie en fonction de l'évolution des hyphes. Les plus jeunes, situées à l'extrémité de l'arbuscule, ne montrent pas d'activité phosphatasique alcaline, celle-ci apparaît lorsque l'hyphe devient mature, et que son système vacuolaire se développe. Puis cette activité enzymatique disparaît lorsque l'arbuscule dégénère et que ses branches se vident de leur contenu et s'effondrent.

Cette activité phosphatasique alcaline est donc caractéristique d'un certain stade d'évolution de l'arbuscule (DEXHEIMER *et al.* 1982 b).

Dans les jeunes hyphes présentant une faible activité phosphatasique, cette dernière est clairement localisée sur le tonoplaste. Cette distribution est moins nette dans les hyphes plus agées présentant une forte activité, où les précipités de phosphate de plomb sont localisés sur le tonoplaste et dans la vacuole. Ceci pourrait s'expliquer par l'activité phosphatasique alcaline particulièrement importante de ces hyphes matures, certains précipités se détachent du tonoplaste et se retrouvent dans la vacuole.

Ces activités augmentent avec la maturation des hyphes arbusculaires. L'activité phosphatasique alcaline totale dans une mycorhize dépend donc du nombre d'arbuscules actifs.

Par électrophorèse sur gel d'acrylamide, V. et S. GIANINAZZI ont mis en évidence une ou plusieurs bandes d'activités phosphatasiques alcalines spécifiques des mycorhizes V.A. (GIANINAZZI-PEARSON et GIANINAZZI 1976, 1978 b). Elles présentent un maximum d'activité lorsque les plantes mycorhizées montrent la plus forte stimulation de croissance. A ce stade, l'observation au microscope électronique de racines révèle la présence d'arbuscules dans un nombre important de cellules corticales.

Au moment où la stimulation de croissance est la plus forte, partie des arbuscules est formée la plus grande d'hyphes appareil vacuolaire présentant un bien développé (GIANINAZZI-PEARSON et al. 1978 b). A ce stade, il y a donc multiplication des sites actifs, ce qui explique aisément la forte activité des bandes obtenues par électrophorèse. Dans notre matériel c'est également au niveau des hyphes les plus vacuolisées que l'activité phosphatasique alcaline est la plus forte.

Il a été constaté que ces bandes d'activité phosphatasique alcaline sont inhibées par le cyanure de potassium. De même, en ajoutant ce dernier au milieu d'incubation dans les techniques de microscopie électronique, nous n'observons plus aucun précipité dans les vacuoles. Ceci confirme que les activités phosphatasiques alcalines observées sur gel, correspondent à celles localisées sur le tonoplaste des endophytes (DEXHEIMER *et al.* 1982 b).

Les mycorhizes V.A. sont caractérisées par leur système vacuolaire composé, à maturité des hyphes, de nombreuses vacuoles rondes. Dans les vacuoles fongiques, il a été mis en évidence des granules de polyphosphate (COX *et al.* 1975; LING-LEE *et al.* 1975; CALLOW *et al.* 1978; WHITE et BROWN 1979; COX *et al.* 1980; STRULLU *et al.* 1981 a et b). Les hyphes lysées, mortes ne renferment pas de granule (STRULLU *et al.* 1981 b, 1985).

endomycorhizogènes Les champignons V. A. prélèvent le phosphore du sol et le transportent dans leurs hyphes par des mécanismes actifs (PEARSON et TINKER 1975; COOPER et TINKER 1978, GIANINAZZI-PEARSON et GIANINAZZI 1986). Ce phosphore est 1981: stocké sous forme de granules de polyphosphate dans les vacuoles 1975, et et al. STRULLU 1981 fongiques (COX al. a; GIANINAZZI-PEARSON et GIANINAZZI 1986). L'endophyte utilise ce phosphore stocké en dégradant les granules de polyphosphate. Les phosphatases alcalines interviendraient dans le transfert du phosphate de la vacuole au cytoplasme fongique (DEXHEIMER et al. 1982 a et b, 1986; KREUTZ-JEANMAIRE et al. 1988 b).

.

# PHOTOGRAPHIQUES

N 35 à 36

Ultrastructure des mycorhizes de Prunus avium / Glomus mosseae (figs. 1, 5 et 6) et Prunus avium / Glomus intraradices (figs. 2 à 4).

Mise en évidence des activités phosphatasiques alcalines. Milieu faisant intervenir le plomb comme agent de capture. Contrastant: acétate d'uranyle.

Figure 1: Hyphe intercellulaire. Les activités phosphatasiques alcalines sont présentes dans les vacuoles fongiques. (X 10500)

<u>Figure 2:</u> Le tronc de l'arbuscule renferme de nombreuses vacuoles présentant des précipités de phosphate de plomb. (X 6000)

Figures 3 et 4: Détails de la zone précédente. Une forte activité phosphatasique alcaline est présente sur le tonoplaste des vacuoles fongiques au niveau du tronc. Lorsque les hyphes sont jeunes et peu vacuolisées (fig. 4), l'activité phosphatasique est faible. (X 25000) (X 27000)

Figure 5: Petites branches arbusculaires. Au fur et à mesure que l'hyphe se vacuolise, une activité apparaît dans certaines vacuoles. (X 30000)

<u>Figure 6:</u> Aucune activité phosphatasique alcaline dans les structures arbusculaires effondrées. (X 17000)



•

Mise en évidence des activités phosphatasiques alcalines dans les hyphes de Mucor sp. (figs, 1 à 5),

Témoins (fig. 5 : Mucor; fig. 6 : Prunus avium/Glomus intraradices) réalisés en incubant les objets en présence de KCN. Milieu faisant intervenir le plomb comme agent de capture (figs. 1, 2, 5 et 6) et milieu de ROBINSON et KARNOVSKY faisant intervenir le cérium comme agent de capture (figs. 3 et 4). Contrastant: acétate d'uranyle.

Figures 1 et 3:

Jeunes hyphes de Mucor.

Le cytoplasme est peu vacuolisé. Les précipités de phosphate plomb (fig. 1) et de phosphate de cérium (fig. 3) ne sont de présents que dans une vacuole (flèche). (X 13500) (X 16500)

# Figures 2 et 4:

Hyphes plus agées et bien vacuolisées.

Toutes les vacuoles fongiques ne sont pas réactives. Deux catégories de vacuoles sont discernables, dont une avec des activités phosphatasiques alcalines sur le tonoplaste (flèches). (X 19000) (X 17000)

Figure 5: Témoin des activités phosphatasiques alcalines. Aucun précipité n'est visible dans l'hyphe du Mucor. (X 12500)

Figure 6: Témoin des activités phosphatasiques alcalines. Mycorhize de Prunus avium / Glomus intraradices. Les hyphes ne révèlent aucune activité phosphatasique alcaline. Noter la présence de granules de polyphosphate dans les vacuoles fongiques.

(X 15000)


## CONCLUSION GENERALE

Peu de travaux de microscopie ont été consacrés à l'étude d'essences ligneuses, pourtant à l'heure actuelle l'arbre, la forêt prennent un intérêt grandissant et, une meilleure connaissance des associations mycorhiziennes des essences ligneuses est essentielle.

L'organisation ultrastructurale des mycorhizes à vésicules et arbuscules du merisier, du pommier et du catalpa n'est pas différente de celle qui a été décrite dans diverses espèces herbacées ou ligneuses (SCANNERINI et BELLANDO 1967, 1968; SCANNERINI 1972; KASPARI 1973, 1975; COX et SANDERS 1974; OLD et NICOLSON 1975; KINDEN et BROWN 1975 a, b, c, 1976; SCANNERINI et BONFANTE-FASOLO 1976, 1979, 1982, 1983; STRULLU 1976, 1978; 1977; CARLING et al. BONFANTE-FASOLO SCANNERINI et 1977: BONFANTE-FASOLO 1978; DEXHEIMER et al. 1979; HOLLEY et PETERSON 1979; WALKER et POWELL 1979; BONFANTE-FASOLO *et al.* GRIPPIOLO 1981; KARIYA et TOTH 1981; MARX 1981; MORANDI al. 1981; 1981; BONFANTE-FASOLO 1982; DEXHEIMER et al. 1982 a; GIANINAZZI et al. 1984; PONS 1984; BONFANTE-FASOLO 1984; DEXHEIMER et al. 1985 a; KREUTZ-JEANMAIRE et DEXHEIMER 1986; DEXEIMER et al. 1986 a, b; JAQUELINET-JEANMOUGIN BOUDARGA 1986; et DEXHEIMER 1988; KREUTZ-JEANMAIRE et al. 1988 a, b; BOUDARGA 1989).

Quelques particularités ont cependant été observées, suivant les couples étudiés, au niveau des hyphes intercellulaires, de l'augmentation du volume cytoplasmique ou des modifications plastidiales dans les cellules infectées.

Dans les mycorhizes de merisier obtenues en conditions contrôlées, l'endophyte progresse dans les méats et y établit un réseau lâche d'hyphes intercellulaires. Dans les mycorhizes "naturelles" de merisier (KREUTZ-JEANMAIRE et DEXHEIMER 1986; KREUTZ-JEANMAIRE et al. 1988 a), les hyphes intercellulaires sont enrobées dans un ciment de nature polysaccharidique, et leur aspect évoque celui d'un "réseau de Hartig". La différence que nous avons observée entre les mycorhizes obtenues en conditions controlées et les mycorhizes naturelles du merisier, nous montre l'endophyte peut moduler dans une certaine aue mesure l'organisation ultrastructurale de la mycorhize.

De même, en associant *Glomus intraradices* aux trois essences ligneuses étudiées, nous avons vu que, dans une certaine mesure, l'hôte est capable de moduler l'organisation de la mycorhize.

Dans la nature des mycorhizes V.A. sont présentes toute l'année sur le système racinaire des merisiers, mais elles sont plus ou moins actives suivant la saison et l'état physiologique de l'arbre. La présence de nombreux granules de polyphosphate, dans les vacuoles fongiques, semble indiquer une non utilisation du phosphore, et donc une symbiose peu active. La diminution des granules de polyphosphate et la formation de nombreux arbuscules dans les cellules de l'hôte indiquent l'existence d'échanges actifs entre les partenaires de la symbiose; le phosphore est utilisé et n'est plus stocké. L'observation des mycorhizes d'essences ligneuses, nous a permis de mettre en évidence certains mécanismes intervenant lors de la pénétration de l'endophyte dans la cellule-hôte. Nous nous sommes également intéressée aux modifications structurales de la cellule-hôte au cours de l'évolution des arbuscules.

Dans une seconde partie de notre travail, nous nous sommes appliquée à localiser des activités enzymatiques entrant dans le métabolisme du carbone (phosphatases neutres, glucose-6phosphatase) et du phosphore (phosphatases alcalines, glucose-6phosphatase) afin de mieux comprendre les échanges existant entre les deux partenaires.

### Dans cette conclusion générale en intégrant tous les résultats que nous avons obtenus, <u>nous proposons un modèle de</u> <u>fonctionnement des mycorhizes à vésicules et arbuscules</u>.

Aprés pénétration de l'endophyte dans la racine, un important réseau d'hyphes intercellulaires colonise les méats. Ces hyphes ne sont pas libres dans les méats, mais elles s'y ancrent par des protubérances ou des épaississement de leur paroi. Les méats intercellulaires sont donc plus qu'une voie de passage inerte puisqu'il y a fixation de l'endophyte sur la paroi de l'hôte ce qui indique l'existence d'une interaction entre les deux partenaires.

Le processus d'établissement de la mycorhize débute lorsque le champignon perfore la paroi cellulaire et pénètre dans la cellule. Cette pénétration se fait à partir d'une ramification d'une hyphe intercellulaire.

La perforation de la paroi de la cellule-hôte fait d'abord appel à une attaque enzymatique très localisée. Nous avons mis en évidence pour le catalpa l'existence, chez l'endophyte au niveau de hyphes arbusculaires, d'un équipement enzymatique capable de dépolymériser des fibrilles polysaccharidiques. Il n'est pas impossible que ce soit ces mêmes enzymes qui agissent sur la paroi cellulaire et qui soient capables d'en modifier la structure. Nous rappelerons également que nous avons signalé la présence de corps multivésiculaires dans le cytoplasme du champignon au niveau des pénétrations. Il se pourraient que ces corps interviennent dans le transport et l'excretion des enzymes lytiques. L'endophyte exerce ensuite une poussée mécanique pour franchir la paroi cellulaire désorganisée, il est certain qu'une solide fixation des hyphes dans les méats comme nous l'avons signalé précedemment, permet une poussée plus efficace lors de la pénétration de l'hyphe dans la cellule.

L'hôte ne reste pas passif, et dès ce stade il réagit en tentant de bloquer l'avance du champignon en produisant du matériel polysaccharidique au niveau de la perforation.

L'étape suivante de l'envahissement cellulaire est la ramification du champignon et l'édification de l'arbuscule.

Nous nous intéresserons principalement aux arbuscules car c'est à ce niveau que se font les échanges entre les deux partenaires de la symbiose. Les arbuscules sont particulièrement abondants dans les cellules les plus proches de l'endoderme, les éléments nutritifs de la plante circulent dans le cylindre central et le champignon est 'attiré par la proximité de cette source alimentaire.

L'établissement des arbuscules et leur évolution entrainent des modifications structurales de la cellule-hôte. L'invasion d'une cellule par le champignon est caractérisée par l'augmentation considérable du volume cytoplasmique donc du plasmalemme, et la régression du système vacuolaire.

Le plasmalemme qui entoure toutes les branches arbusculaires n'est jamais rompu. Il y a donc, pendant la phase d'invasion très rapide de la cellule, une synthèse de matériel plasmalemmique qui doit mobiliser une partie importante du métabolisme de la Ce s'il est bien cellule-hôte. plasmalemme néoformé, du plasmalemme comme le confirme la coloration à l'acide phosphotungstique, ne possède pas les mêmes caractéristiques chimiques (GIANINAZZI-PEARSON et al. 1989) que le plasmalemme qui borde la cellule. Il est également capable de produire de nombreux plasmalemmasomes. La présence d'activité enzymatiques, comme les phosphatases neutres, sur le plasmalemme qui entoure les hyphes arbusculaires et l'absence de ces mêmes activités sur le plasmalemme qui borde la cellule, montre que le plasmalemme néoformé a un caractère original. Nous rappelerons que nous avons par ailleurs localisé ces activités sur le plasmalemmme de cellules en cours de différenciation. Le plasmalemme néoformé ou membrane périsymbionte présente donc des caractéristiques de plasmalemme juvénile.

Cette évolution du plasmalemme permet la mise en place d'une structure d'échange active: l'interface.

paroi l'endophyte est La de également simplifiée (BONFANTE-FASOLO et GRIPPIOLO 1982, GRANDMAISON et al. 1988, JABAJI-HARE et al. 1990). Elle s'amincit des hyphes externes jusqu'aux hyphes arbusculaires les plus fines (GIANINAZZI-PEARSON et al. 1981), elle passe d'une structure plurilamellaire (hyphes et peloton) à une structure unistratifiée externes (hyphes intercellulaires intracellulaires) et etprésente des modifications cytochimiques. L'utilisation d'une lectine couplée à l'or colloïdal nous a permis de mettre en évidence ce phénomène de simplification des structures pariétales. La modification structurale de la paroi des hyphes arbusculaires favorise les échanges entre les deux partenaires.

Comme nous l'avons déjà signalé, la cellule-hôte réagit à l'infection en édifiant une barrière pariétale autour du champignon, c'est la couche d'isolement. De nombreux contacts ont été observés entre le réticulum endoplasmique et la membrane périsymbionte. De même, nous avons mis en évidence un passage de matériel polysaccharidique d'une travée réticulaire dans la matrice. Toutes ces observations laissent penser que le réticulum endoplasmique intervient dans le transport et le tranfert des sucres vers l'interface.

Après phosphorylation du glucose, le passage du glucose-6-phosphate à travers le plasmalemme de l'hôte est catalysé par la glucose-6-phosphatase avec production de glucose et de phosphore. Les sucres sont polymérisés sous l'action

d'enzymes incluses dans la membrane périsymbionte. Une activité phosphatasique neutre a été révélée à ce niveau. Dans la matrice, ces sucres polymérisés vont constituer la couche d'isolement. Cette couche n'a pas une épaisseur constante. Elle est constituée de quelques fibrilles, autour des ramifications les plus fines de l'arbuscule où ces fibrilles ne peuvent s'assembler et où elles forment, tout au plus, un halo lâche. La couche d'isolement est plus importante autour des grosses branches. Lorsque l'arbuscule entre en dégénérescence, les branches s'agglomèrent et les restes fongiques sont encapsulés dans du matériel polysaccharidique. HARLEY et SMITH (1983) suggèrent que l'activité du champignon vivant empêche l'édification d'une paroi autour des hyphes.

L'endophyte exerce une action de lyse enzymatique, en dépolymérisant les fibrilles polysaccharidiques du matériel d'encapsulement et en libérant des sucres solubles dans l'espace périplasmique.

Le champignon prélève les sucres solubles dans la matrice et s'en nourrit. Pour assurer les phosphorylations nécessaires au transport transmembranaire des sucres solubles, l'endophyte amène au niveau de l'interface du phosphore. Ce dernier prélevé dans le sol, transporté dans les hyphes, est stocké dans les vacuoles fongiques sous forme de granules de polyphosphate. Sur les lieux de leur utilisation (arbuscules), ces polyphosphates sont dégradés et transférés de la vacuole au cytoplasme du champignon, les phosphatases alcalines localisées sur le tonoplaste des vacuoles fongiques interviendraient dans ces phénomènes.

Les sucres solubles phosphorylés traversent la paroi et le plasmalemme fongique; les activités NDPasiques et glucose-6-phosphatasiques sont les marqueurs de ces processus.

L'énergie nécessaire au transport actif étant fournie par la dégradation de l'ATP par les ATPases plasmalemmiques localisées sur la membrane périsymbionte et sur le plasmalemme du champignon (MARX 1981; MARX *et al.* 1982; GIANINAZZI-PEARSON *et al.* 1984; DEXHEIMER *et al.* 1986 a, KREUTZ-JEANMAIRE *et al.* 1988 b).

Une partie du phosphore destiné à la phosphorylation des sucres diffuse dans la matrice, les ATPases plasmalemmiques de la cellule-hôte permettent le passage de ce phosphore vers la plante-hôte. Le modèle de fonctionnement que nous proposons, modifié d'après celui de WOOLHOUSE (1975), est résumé dans le schéma suivant:



Dans ce modèle, chaque partenaire de la symbiose dévie à son profit un processus métabolique de l'autre partenaire: synthèse de matériel pariétal déviée par le champignon, et phosphore libéré par les mécanismes de phosphorylation dévié par la plante-hôte.

Si cette symbiose est synonyme d'échanges, elle est également inductrice de profondes transformations au niveau plastidial.

Plusieurs auteurs signalent la réduction de la taille des grains d'amidon, ou leur absence dans les plastes des cellules infectées (c'est le cas du catalpa) lorsque l'arbuscule est vivant. Dans les mycorhizes de pommier et de merisier, la transformation est encore plus remarquable, puisque nous observons la présence de leucoplastes sécréteurs dans les cellules renfermant un arbuscule vivant. L'évolution des plastes en leucoplastes sécréteurs suggère une forte activité antifongique de la cellule-hôte (production de phytoalexines).

Il semble donc que la symbiose mycorhizienne soit en fait une relation plus complexe qu'un simple échange, comme le montre l'ensemble des faits que nous avons relatés:

- réaction de défense de la plante-hôte qui bloque le champignon en édifiant une barrière pariétale

- pas de véritable échange de nutriments mais une déviation forcée du métabolisme de l'autre partenaire

- analogie de l'infection mycorhizienne avec une attaque parasitaire et production de leucoplastes sécréteurs de terpènes antifongiques.

Cette relation est encore compliquée en milieu naturel par les facteurs externes (facteurs climatiques, microflore tellurique) et les modifications physiologiques de la plante-hôte au cours des saisons. Pourtant sur le système racinaire des merisiers récoltés dans la nature, nous avons observé une persistance de la symbiose durant toute la saison de végétation.

Mais qu'il s'agisse d'une véritable symbiose ou d'une sorte de "parasitisme mutuel", il ne fait aucun doute que la mycorhization est un apport important et essentiel dans la vie de la plante.

# **BIBLIOGRAPHIE**

ALLEN J.M., 1963 a. The propreties of Golgi-associated nucleoside diphosphatase and thiamine pyrophosphatase. I. Cytochemical analyse. Jour. Histochem. Cytochem., 11, 529-541. ALLEN J.M., 1963 b. The propreties of Golgi-associated nucleoside diphosphatase and thiamine pyrophosphatase. II. Electrophoretic separation and identification. Jour. Histochem. Cytochem., 11, 542-552. ALWIS J.M., ABEYBAYNAKE K., 1980. A survey of mycorrhizae in some forest trees of Sri Lanka. In: "Tropical Mycorrhizal Research", Eds. MIKOLA P., Cambridge University Press, 135-155. ANTOINE J.C., PRINA E., JOUANNE C., BONGRAND P., 1990. Parasitophorous vacuoles of Leishmania amazanensis infected macrophages maitain an acidic pH. Infection and immunity, 58, 779-787. ARION W.Y., NORDLIE R.C., 1964. Liver microsomal glucose-6-phosphatase, inorganic pyrophosphatase pyrophosphatase-glucose phosphotransférase. II. Kinetic and studies . J. Biol. Chem., 239, 2752-2757. BAYLIS G.T.S., 1961. The significance of mycorrhizas and root nodules in New Zealand vegetation. Proc. R. Soc. N.Z., 89, 45-50. BEVEGE D.I., BOWEN G.D., 1975. Endogone strain and host plant differences in development of vesicular arbuscular mycorrhizas. In: "Endomycorrhizas", Eds SANDERS F.E., MOSSE B., TINKER P.B., Academic Press, 77-86. BONFANTE-FASOLO P., 1978. ultrastructural features of the vesicular-arbuscular Some mycorrhiza in the grape vine. Vitis, 17, 386-395. BONFANTE-FASOLO P., 1982. Cell Wall Architectures in a Mycorrhizal Association as Revealed by Cryoultramicrotomy. Protoplasma, 111, 113-120. BONFANTE-FASOLO P., 1984. Anatomy and Morphology. In: "VA mycorrhiza", Eds POWELL C.Ll., BAGYARAJ D.J., C.R.C. Press, USA, 5-29.

BONFANTE-FASOLO P., 1987. Vesicular-arbuscular mycorrhizae: Fungus-plant interactions at the cellular level. Symbiosis, 3, 249-268.

BONFANTE-FASOLO P., SCANNERINI S., 1977. A cytological study of the vesicular-arbuscular mycorrhiza in Ornithogalum umbellatum L. Allionia, 22, 5-21.

BONFANTE-FASOLO P., DEXHEIMER J., GIANINAZZI S., GIANINAZZI-PEARSON V., SCANNERINI S., 1981. Cytochemical modifications in the host-fungus interface during intracellular interactions in vesicular-arbuscular mycorrhizae. Plant Sci. Letters, 22, 13-21.

BONFANTE-FASOLO P., GRIPPIOLO R., 1982. Ultrastructural and cytochemical changes in the wall of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus during symbiosis. Can. J. Bot., 60, 2303-2312.

BONFANTE-FASOLO P., GIANINAZZI-PEARSON V., MARTINENGO L., 1984. Ultrastructural aspects of endomycorrhizas in the Ericaceae. IV. Comparison of infection by *Pezizella ericae* in host and non host-plants. New Phytol., 98, 329-333.

BONFANTE-FASOLO P., FONTANA A., 1985. VAM fungi in *Ginkgo biloba* roots: their interactions at cellular level. Symbiosis, 1, 53-67.

BONFANTE-FASOLO P., GIANINAZZI-PEARSON V., 1986 a. Wall and plasmalemma modifications in mycorrhizal symbiosis. Actes 1er Symp. Europ. Mycor. Dijon, Eds. GIANINAZZI-PEARSON V., GIANINAZZI S., INRA, 65-73.

BONFANTE-FASOLO P., VIAN B., TESTA B., 1986 b. Ultrastructural localization of chitin in the cell wall of a fungal spore. Biol. of Cell, 57, 265-270.

BOUDARGA K., 1989. Etude des mycorhizes de l'*Eucalyptus camaldulensis*. Application pratique à la mycorhization de vitroplants. Thèse de l'Université de Nancy I, 188 pages.

BOUDARGA K., DEXHEIMER J., 1988. Etude ultrastructurale des endomycorhizes à vésicules et arbuscules de jeunes plants d'*Eucalyptus camaldulensis* (Dehnadt) (Myrtacées). Bull. Soc. Bot. Fr., 135, 111-121.

BOULLARD B., 1968. "Les mycorrhizes". Eds. MASSON et Cie, PARIS, 135 pages.

BRACKER C.E., LITTLEFIELD L.J., 1973. Structural concepts of host-pathogen interfaces. In: "Fungal pathogenicity and the plant's response", Eds. BYRDE R.J.W. and CUTTING C.V., Academic Press, London, New York, 159-317. BRUCE R.J., WEST C.A., 1982. Elicitation of casbene synthetase activity in castor bean. The role of pectic fragments of the plant cell wall in elicitation by a fungal endopolygalacturonase. Plant Physiol., 69, 1181-1188. BRUNETEAU M., RICCI P., 1988. Elicitation et résistance induite. Cryptogamie, Mycol., 9, 173-189. CALLOW J.A., CAPPACIO L.C.M., PARISH G., TINKER P.B., 1978. Detection and estimation of polyphosphate in vesicular-arbuscular mycorrhizas. New Phytol., 80, 125-134. CAMARA B., 1984. Terpenoid metabolism in plastids. Sites of phytoene synthetase activity and synthesis in plant cells. Plant Physiol., 74, 112-116. CARLING D.E., WHITE J.A., BROWN M.F., 1977. The influence of fixation procedure on the ultrastructure of the host endophyte interface of vesicular-arbuscular mycorrhizae. Can. J. Bot., 55, 48-51. CARLING D.E., BROWN M.F., 1982. Anatomy and physiology of vesicular-arbuscular and nomycorrhizal roots. Phytopathol., 72, 1108-1114. CHENICLET C., CARDE J.P., 1985. Presence of leucoplasts in secretory cells and of monoterpenes in the essential oil: a correlative study. Isr. J. Bot., 34, 219-238. CHENICLET C., CARDE J.P., 1988. Differentiation of leucoplasts: comparative transition of proplastids to chloroplasts or leucoplasts in Trichomes of Stachys lanata leaves. Protoplasma, 143, 74-83. COOPER K.M., TINKER P.B., 1978. Translocation and transfer of nutrients in vesicular-arbuscular mycorrhizas. II. Uptake and translocation of phosphorus, zinc and sulphur. New Phytol., 81, 43-52. COOPER K.M., TINKER P.B., 1981. Translocation and transfer of nutrients in vesicular-arbuscular IV. Effect of environmental variables on movement mycorrhizas. of phosphorus. New Phytol., 88, 327-339.

COX G., SANDERS F.E., 1974. Ultrastructure fungus interface in a of thehost vesicular-arbuscular mycorrhiza. New Phytol., 73, 901-912. COX G., SANDERS F.E., TINKER P.B., WILD J.A., 1975. Ultrastructural evidence relating the host-endophyte transfer in a vesicular-arbuscular mycorrhiza. In: "Endomycorrhizas", Eds. SANDERS F.E., MOSSE B., TINKER P.B., Academic press, London, 297-312. COX G., TINKER P.B., 1976. Translocation and transfer of nutrients in vesicular-arbuscular mycorrhizas. I. The arbuscule and phosphorus transfer: а quantitative ultrastructural study. New Phytol., 84, 371-378. COX G., MORAN K.J., SANDERS F.E., NOCKOLDS G., TINKER P.B., 1980. Translocation and tranfer nutrients in vesicular-arbuscular III. Polyphosphate granules and phosphorus mvcorrhizas. translocation. New Phytol., 84, 649-659. DARGENT R., TOUZE-SOULET J.M., MONTANT C., 1982. Localisation de l'activité glucose-6-phosphatasique chez quelques champignons filamenteux. Biol. Cell, 46, 311-320. DAUWALDER M., WHALEY W.G. and KEPHART J.E., 1969. Phosphatase and differenciation of the Golgi apparatus. J. Cell. Sci., 4, 455-497. DAUWALDER M., WHALEY W.G. and KEPHART J.E., 1972. Functional aspects of Golgi apparatus. Sub. Cell Biochem., 1, 225-275. DEXHEIMER J., 1978. Etude de la sécrétion de mucilage par les cellules des glandes digestives de Drosera capensis L. Localisation ultrastructurale des phosphatases neutres et de l'ATPase. Z. Pflanzenphysiol., 92, 191-206. DEXHEIMER J., GIANINAZZI S., GIANINAZZI-PEARSON V., 1979. Ultrastructural histochemistry of the host-fungus interfaces in the endomycorrhizal association Glomus mosseae/ Allium cepa. Z. Pflanzenphysiol., 92, 191-206. DEXHEIMER J., GIANINAZZI-PEARSON V., GIANINAZZI S., 1982 a. Acquisitions récentes sur la physiologie des mycorhizes VA au niveau cellulaire. Les Colloques de l'INRA, "Les Mycorhizes, partie intégrante de la plante: biologie et perspectives d'utilisation", 13, 61-73.

DEXHEIMER J., GIANINAZZI-PEARSON V., GIANINAZZI S., MARX C., 1982 b. Rôle possible de la vacuole du champignon symbiotique des mycorhizes V.A. dans la nutrition des plantes. Bull. Soc. Bot. Fr., Actual. Bot., 129, 29-34.

DEXHEIMER J., MULLER J., RIEDACKER A., 1982 c. Etude ultrastructurale des coiffes des racines de chêne (*Quercus robur*). I. Les pivots. Can. J. Bot., 60, 620-629.

DEXHEIMER J., MARX C., GIANINAZZI-PEARSON V., GIANINAZZI S., 1985 a. Ultracytological studies of plasmalemma formations produced by host and fungus in vesicular-arbuscular mycorrhizae. Cytologia, 50, 461-471.

DEXHEIMER J., GERARD J., LEDUC J.-P., CHEVALIER G., 1985 b. Etude ultrastructurale comparée des associations symbiotiques mycorhiziennes Helianthemum salicifolium - Terfezia claveryi et Helianthemum salicifolium - Terfezia leptoderma. Can. J. Bot., 63, 582-591.

DEXHEIMER J., KREUTZ-JEANMAIRE C., GERARD J., 1986 a. Sur l'existence de contacts entre les travées du réticulum endoplasmique et le plasmalemme de l'interface dans les cellules-hôtes des mycorhizes VA. Biol. Cell., 57, 4a.

DEXHEIMER J., KREUTZ-JEANMAIRE C., GIANINAZZI-PEARSON V., GIANINAZZI S., 1986 b. Approche, au niveau cellulaire du fonctionnement des endomycorhizes: les plasmalemmes de l'interface. Actes 1er Symp. Europ. Mycor., Dijon, Eds. GIANINAZZI-PEARSON V., GIANINAZZI S., INRA, 277-283.

DEXHEIMER J., GERARD J., JEANMAIRE C., 1989. Modifications structurales et fonctionnelles des cellules hôtes dans les mycorhizes à vésicules et arbuscules. IVth Int. Colloquium on Endocytobiology and Symbiosis, Lyon, juillet.

DEXHEIMER J., GERARD J., BOUDARGA K., KREUTZ-JEANMAIRE, 1990. Les plastes dans les cellules-hôtes des mycorhizes à vésicules et arbuscules. Can. J. Bot., 68, 50-55.

DICKMAN L.A., LIBERTA A.E., ANDERSON R.C., 1984. Ecological interaction of little bluestem and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. Can. J. Bot., 62, 2272-2277.

DUDLEY M.W., DUEBER M.T., WEST C.A., 1986. Biosynthesis of the macrocyclic diterpene casbene in castor bean (Ricinus communis L.) seedlings. Changes in enzyme levels induced by fungal infection and intracellular localization of the pathway. Plant Physiol., 81, 335-342. EHRLICH M.A., EHRLICH H.G., 1971. Fine structure of the host-parasite interfaces in mycoparasitism. Ann. Rev. Phytopathol., 9, 155-184. FRANK A.B., 1885. Über die auf Wurzelsymbiose beruhende Ernährung gewisser Baüme durch unterirdische Pilze. Ber. Dtsch. Bot. Ges., 3, 128-145. FUSCONI A., BONFANTE-FASOLO P., 1984. Ultrastructural aspects of host-endophyte relationships in Arbutus unedo L. mycorrhizas. New Phytol., 96, 397-410. GERDMANN J.W., TRAPPE J.M., 1974. The endogonaceae in the Pacific Northwest. Mycologia Memoir, 5, 76 pp. GIANINAZZI S., GIANINAZZI-PEARSON V., DEXHEIMER J., 1979. Enzymatic studies on the metabolism of vesicular-arbuscular mycorrhiza. III. Ultrastructural localization of acid and alkaline phosphatase in onion roots infected by Glomus mosseae (Nicol. and Gerd.). New Phytol., 82, 127-132. GIANINAZZI S., DEXHEIMER J., GIANINAZZI-PEARSON V., MARX C., 1983. Role of the host-arbuscule interface in the V.A. mycorrhizal symbiosis: ultracytological studies of processes involved in phosphate and carbohydrate exchange. Plant and soil, 71, 211-215. GIANINAZZI-PEARSON V., 1985. compatibility specificity, in Host-fungus recognition and mycorrhizae. In: "Plant Gene Research - Genes involved in microbe plant interactions", Eds. VERMA D.P.S., HOLN TH., Springer Verlag, Berlin, 225-253. GIANINAZZI-PEARSON V., GIANINAZZI S., 1976. Enzymatic studies on the metabolism of vesicular-arbuscular mycorrhiza. I. Effect of mycorrhiza formation and phosphorus nutrition on soluble phosphatases activities in onion roots. Physiol. Vég., 14, 833-841.

GIANINAZZI-PEARSON V., GIANINAZZI S., 1978 a. Enzymatic studies on the metabolism of vesicular-arbuscular mycorrhiza. II. Soluble alkaline phosphatase specific to mycorrhizal infection in onion roots. Physiol. Plant Pathol., 12, 45-53. GIANINAZZI-PEARSON V., GIANINAZZI S., DEXHEIMER J., BERTHEAU Y., ASIMI S., 1978 b. phosphatases Les alcalines solubles dans l'association endomycorhizienne à vésicules et arbuscules. Physiol. Vég., 16, 671-678. GIANINAZZI-PEARSON V., MORANDI D., DEXHEIMER J., GIANINAZZI S., 1981. Ultrastructural and ultracytochemical feature of a Glomus tenuis mvcorrhiza. New Phytol., 88, 633-639. GIANINAZZI-PEARSON V., DEXHEIMER J., GIANINAZZI S., JEANMAIRE C., 1984. Plasmalemma structure and function in endomycorrhizal symbioses. Zeit. Pflanzenphysiol., 124, 201-205. GIANINAZZI-PEARSON V., GIANINAZZI S., 1986. Connaissances actuelles des bases physiologiques et biochimiques des effets des endomycorhizes sur le comportement des plantes. Physiol. vég., 24, 253-262. GIANINAZZI-PEARSON v., GIANINAZZI S., BREWIN N.J., 1989. localisation of antigenic sites in the Immunocytochemical perisymbiotic membrane of vesicular-arbuscular endomycorrhiza monoclonal antibodies reacting against the bacterioid using membrane of nodules. IVth Int. Coll. on Endocytobiology and Symbiosis, Eds. NARDON P., GIANINAZZI-PEARSON V., GRENIER A.M., MARGULIS L., SMITH D.C., INRA, Lyon, juillet 1989, 127-131. GIOVANNETTI M., 1985. Seasonal variations of vesicular-arbuscular mycorrhizas and endogonaceous spores in a maritime sand dune. Trans. Br. Mycol. Soc., 84, 679-684. GIRAUD G., 1968. Localisation des activités phosphatasiques chez les végétaux. Bull. Soc. Fr. de Physiol. vég., 14, 149-163. GLEIZES M., PAULY G., CARDE J.P., MARPEAU A., BERNARD-DAGAN C., 1983. Monoterpene hydrocarbon biosynthesis by isolated leucoplasts of Citrofortunella mitis. Planta, 159, 373-381. GOFF C.W., 1973. Localization of nucleoside diphosphatase in the onion root tip. Protoplasma, 78, 397-416.

GOLFISHER S., ESSNER E., SCHILLER B., 1971. Nucleoside diphosphatase and thiamine pyrophosphatase activities in the endoplasmic reticulum and golgi apparatus. Jour. Histochem. Cytochem., 19, 349-360. GRANDMAISON J., BENHAMOU N., FURLAN V., VISSER S.A., 1988. Ultrastructural localization of N-acetylglucosamine residues in the cell wall of Gigaspora margarita throughout its life cycle. Biol. of cell, 63, 89-100. GRIPPIOLO R., 1981. Il processo di infezione di un fungo vesicolo-arbuscolare. Ι. Osservazioni ultrastrutturali sulla penetrazione del fungo da cellula a cellula nella radice. Allionia, 24, 49-53. HADLEY G., 1975. Organization and fine structure of orchid mycorrhiza. "Endomycorrhizas", Eds. SANDERS F.E., MOSSE B., TINKER P.B. In: Academic Press, London, New York, 335-351. HADLEY G., JOHNSON R.P.C., JOHN D.A., 1971. Fine structure of the host-fungus interface in orchid mycorrhiza. Planta, 100, 191-199. HALL J.L., 1978. Electron microscopy and cytochemistry of plant cells. Elsevier, North Holland, Biomedical Press, Amsterdam-Oxford-New York. HARLEY J.L., SMITH S.E., 1983. Mycorrhizal symbiosis. Academic Press, London, New York. HARLEY J.L., HARLEY E.L., 1987. A check-list of mycorrhiza in the british flora. New Phytol., (Suppl) 105, 1-102. HOLLEY J.D., PETERSON R.L., 1979. Development of a vesicular arbuscular mycorrhiza in bean roots. Can. J. Bot., 57, 1960-1978. HUGON J.S., BORGERS M., MAESTRACCI D., 1970. Glucose-6-phosphatase and thiamine pyrophosphatase activities in the jejunal epithelium of the mouse. J. Histochem. Cytochem., 18, 361-370. JABAJI-HARE S.H., CHAREST P.M., 1987. Ultrastructural and cytochemical observation on the somatic phase of Endogone pisiformis (Endogonaceae). Mycologia, 79, 433-444. JABAJI-HARE S.H., THERIEN J., CHAREST P.M., 1990. High resolution cytochemical study of the vesicular-arbuscular mycorrhizal association, Glomus clarum x Allium porrum. New Phytol., 114, 481-496.

JACQUELINET-JEANMOUGIN S., 1986. Les endomycorhizes de Gentiana lutea L.: Détermination des champignons symbiotes; aspects physiologiques et ultrastructuraux de ces associations. Thèse de l'Université de Dijon, 131 pages. JACQUELINET-JEANMOUGIN S., GIANINAZZI-PEARSON V., 1983. Endomycorrhizas in the Gentianaceae. I. The fungi associated with Gentiana lutea L. New Phytol., 95, 663-666. JANSEN J.M., 1987. Les endophytes radicaux de quelques plantes javanaises. Annalas Jard. Bot. Buitenz., 14, 53-201. J., MARX C., GIANINAZZI JEANMAIRE С., DEXHEIMER S., GIANINAZZI-PEARSON V., 1985. Effect of vesicular-arbuscular mycorrhizal infection on the distribution of neutral phosphatase activities in root cortical cells. J. Plant Physiol., 119, 285-293. KARIYA N., TOTH R., 1981. Ultrastructure of the mycorrhizal association formed between Zea diploperennis and Glomus fasciculatus. Mycologia, 73, 1027-1039. KASPARI H., 1973. Elektronenmikroskopische Untersuchung zur Feinstruktur der Endotrophen Tabak Mycorrhiza. Archs. Mikrobiol., 92, 201-207. KASPARI H., 1975. Fine structure of the host-parasite interface in endotrophic mycorrhizae of tobacco. In: "Endomycorrhizas", Eds. SANDERS F.E., MOSSE B., TINKER P.B., Academic Press, London, New York, 325-334. KINDEN D.A., BROWN M.F., 1975 a. Electron microscopy of vesicular-arbuscular mycorrhizae of yellow poplar. I. Characterization of endophytic structures by scanning electron stereoscopy. Can. J. Microbiol., 21, 989-993. KINDEN D.A., BROWN M.F., 1975 b. Electron microscopy of vesicular-arbuscular mycorrhizae of yellow poplar. II. Intracellular hyphae and vesicles. Can. J. Microbiol., 21, 1768-1780. KINDEN D.A., BROWN M.F., 1975 c. Electron microscopy of vesicular-arbuscular mycorrhizae of yellow poplar. III. Host endophyte interactions during arbuscular development. Can. J. Microbiol., 21, 1930-1939.

KINDEN D.A., BROWN M.F., 1976. Electron microscopy of vesicular-arbuscular mycorrhizae of yellow poplar. IV.Host endophyte interactions during arbuscular deterioration. Can. J.. Microbiol., 22, 64-75.

KREUTZ-JEANMAIRE C., DEXHEIMER J., 1986. Etude ultrastructurale comparative des endomycorhizes naturelles et artificielles de Merisier. Actes du 1er Symp. Europ. Mycor., Dijon, Eds. GIANINAZZI-PEARSON V., GIANINAZZI S., INRA, 285-289.

KREUTZ-JEANMAIRE C., DEXHEIMER J., GERARD J., 1988 a. Etude de l'organisation ultrastructurale des mycorhizes à vésicules et arbuscules dans deux Rosacées ligneuses (*Prunus avium* L. et *Pirus malus* L.). Phytomorphology, 38, 205-217.

KREUTZ-JEANMAIRE C., DEXHEIMER J., GERARD J., 1988 b. Approche, au niveau cellulaire, du fonctionnement des endomycorhizes à vésicules et arbuscules. Cytologia, 53, 19-32.

KURKDJIAN A., GUERN J., 1989. Intracellular pH: measurement and importance in cell activity. Plant Physiol., 40, 271-303.

LEI J., 1988. Etude experimentale des systèmes symbiotiques mycorhiziens de quelques essences ligneuses. Application pratique à la mycorhization de vitroplants. Thèse de l'Université de Nancy I, 204 pages.

LESKES A., SIEKEVITZ P., PALADE G.E., 1971 a . Differenciation endoplasmic reticulum in hepatocytes. I. Glucose-6-phosphate distribution "in situ". J. Cell Biol., 49, 264-287.

LESKES A., SIEKEVITZ P., PALADE G.E., 1971 b . Differenciation endoplasmic reticulum in hepatocytes. II. Glucose-6-phosphatase in rough microsomes. J. Cell Biol., 49, 288-302.

LITTLEFIELD L.J., BRACKER C.E., 1972. Ultrastructural specialization at the host-pathogen interface in rust-infected flax. Protoplasma, 74, 271-305.

LIM L.L., COLE A.L.J., FINERAN B.A., 1984. Ultrastructure of thick-walled hyphae of *Glomus fasciculatum* in old roots of white clover (*Trifolium repens*). Can. J. Bot., 62, 262-271.

LING-LEE M., CHILVERS G.A., ASHFORD A.E., 1975. Polyphosphate granules in three different kinds of tree mycorrhiza. New Phytol., 75, 551-555.

MALAJCZUK N., LINDERMAN R.G., KOUGH J., TRAPPE J.M., 1981. Presence of vesicular-arbuscular mycorrhizas in Eucalyptus spp. and Acacia sp. and their absence in Barksia sp. after inoculation with Glomus fasciculatus. New Phytol., 87, 567-572. MARUYAMA K., 1974. Localization of polysaccharides and phosphatasees in the Golgi apparatus of Tradescantia pollen. Cytologia, 39, 767-776. MARX C., 1981. Etudes ultrastructurale, cytochimique et cytoenzymologique de quelques types d'associations endomycorhiziennes à vésicules et arbuscules. Thèse de IIIe Cycle, Université de Nancy I, 72 pages. MARX C., DEXHEIMER J., GIANINAZZI-PEARSON V., GIANINAZZI S., 1982. Enzymatic studies on the metabolism of vesicular-arbuscular mycorrhiza. IV. Ultracytoenzymological evidence (ATPase) for active transfer processes in the host arbuscule interface. New Phytol., 90, 37-43. MORANDI D., 1981. Ecologie, ultracytologie et rôle des endomycorhizes chez le framboisier. Thèse de IIIe Cycle, Université de Dijon, 77 pages. MORANDI D., 1987. V.A. mycorrhizae, nematodes, phosphorus and phytoalexins on sovbean. Proc. 7th N. Amer. Conf. Myc., 212. MORANDI D., BAILEY J.A., GIANINAZZI-PEARSON V., 1984. Isoflavonoid accumulation in soybean roots infected with vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. Physiol. Plant Pathol., 24, 357-364. MOSSE B., 1962. The establishment of vesicular-arbuscular mycorrhiza under aseptic conditions. J. Gen. Microbiol., 27,509-520. NAGY S., NORDBY H.E., 1980. Composition of lipids in roots of six Citrus cultivars infected with the vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus Glomus mosseae. New Phytol., 85, 377-384. NAPPI P., 1983. Influenza delle tecniche di lavorazione del suolo e delle stagioni sulle micorrize vescicolo-arbuscolari del melo. Mic. Ital., 3, 39-46.

NICOLSON T.H., JOHNSTON C., 1979. Mycorrhiza in the gramineae. III. Glomus fasciculatus as the endophyte of pioneer grasses in a maritime sand dune. Trans. Br. Mycol. Soc., 72, 261-268. NORDLIE R.C., 1971. Glucose-6-phosphatase, hydrolytic and synthetic activities. In: The enzymes. IV. Hydrolysis, Eds BOYER P.D., Academic press, New York, London, 543-610. NOVIKOFF A.B., GOLDFISCHER S., 1961. Nucleoside diphosphatase activity in the Golgi apparatus and its usefulness for cytological studies. Proc. Nat. Acad. Sci., 47, 802-810. OLD K.M., NICOLSON T.H., 1975. Electron microscopical studies of the mycorrhiza of roots of sand dune grasses. New Phytol., 74, 51-58. PAPADIMITRIOU , VIAN DUIJN, 1970. in HALL J.L., 1978. PARGNEY J.C., 1986. Ultrastructure des tubes polliniques angiospermiens. Etudes cytochimique, cytoenzymologique et expérimentale. Thèse de Doctorat d'état, Université de Nancy I, 180 pages. PEARSON V., TINKER P.B., 1975. Measurement of phosphorus fluxes in the external hyphae of endomycorrhizas. In: "Endomycorrhizas", Eds. SANDERS F.E., MOSSE B., TINKER P.B., Academic Press, London, 277-287. PETERSON T.A., MUELLER C., ENGLANDER L., 1980. Anatomy and ultrastructure of a Rhododendron root-fungus association. Can. J. Bot., 58, 2421-2433. PHILIPPS J.M., HAYMAN D.S., 1970. Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and V.A. mycorrhizal fungi for rapid assessement of infection. Trans. Br. Mycol. Soc. , 55, 158-161. PONS F., 1984. L'endomycorhization VA in vitro de quelques espèces herbacées et ligneuses; aspects ultrastructuraux de l'association. Thèse de IIIe Cycle, Université de Dijon, 116 pages. POUX N., 1967. Localisation d'activités enzymatiques dans les cellules du méristème radiculaire du Cucumis sativus L. phosphatasiques neutres dans les cellules du Ι. Activités protoderme. J. Microscopie, 6, 1043-1058.

POWELL C. L., BAGYARAJ D.J., 1984. VA mycorrhizae: Why all the interest? In: "VA mycorrhiza", Eds. POWELL C. L.1, BAGYARAJ D.J., CRC Press, USA, 1-3. METLINTSKII L.V., PROTSENKO M.A., SHEMAKANOVA N.M., 1971. Ultrastructure of mycorrhiza of the garden pea (Pisum sativum L). Dokl. Akad. Nauk. SSSR, 199, 120-122. RAMBOURG A., 1967. Detection des glycoprotéines en microscopie électronique, coloration de la surface cellulaire et de l'appareil de Golgi par un mélange acide chromique-phosphotungstique. C. R. Acad. Sci., PARIS, 265, 1426-1428. REYNOLDS E.S., 1963. The use of lead citrate at high pH as an electron opaque stain in electron microscopy. J. Cell. Biol., 17, 208-212. ROBERTSON D.C., ROBERTSON J.A., 1985. Ultrastructural aspects of Pyrola mycorrhizae. Can. J. Bot., 63, 1089-1098. ROBINSON J.M., KARNOVSKY M.J., 1983 a. Ultrastructural localization of 5'-nucleotidase in Guinea pig neutrophils based upon the use of cerium as capturing agent. J. Histochem. Cytochem., 31, 1190-1196. ROBINSON J.M., KARNOVSKY M.J., 1983 b. Ultrastructural localization of several phosphatases with cerium. J. Histochem. Cytochem., 31, 1197-1208. ROLAND J.C., 1973. The relationship between the plasmalemma and the plant cell wall. Int. Rev. Cytol., 36, 45-92. ROLAND J.C., LEMBI C., MORRE D.J., 1972. Phosphotungstic acid-chromic acid as a selective electron-dense stain for plasma membrane of plant cells. Stain Technol., 47, 195-200. ROLAND J.C., PILET P.E., 1974. Implications du plasmalemme et de la paroi dans la croissance des cellules végétales. Experientia, 30, 441-451. ROTHSTEIN A., 1954. The enzymology of the cell surface. In: Protoplasmacytologia, Band II., Eds. HEILBRUNN L.V., WEBER F., Wein Springer-Verlag, 1-86. SCANNERINI S., 1972. Ultrastruttura delle Endomicorrize di Ornithogalum umbellatum L. all'inizio dell'attività vegetativa. Allionia, 18, 129-150.

SCANNERINI S., BELLANDO M., 1967. Some ultrastructural features of endotrophic mycorrhiza in Ornithogalum umbellatum. G. Bot. Ital., 101, 313-324.

SCANNERINI S., BELLANDO M., 1968. Sull'ultrastruttura delle micorrize endotrofische di Ornithogalum umbellatum L. in attività vegetativa. Atti Accad. Sci. Torino, 102, 795-809.

SCANNERINI S., BONFANTE P., FONTANA A., 1975. An ultrastructural model for the host-symbiont interaction in the endotrophic mycorrhizae of *Ornithogalum umbellatum* L. In: "Endomycorrhizas", Eds. SANDERS F.E., MOSSE B., TINKER P.B., Academic Press, London, 313-324.

SCANNERINI S., BONFANTE-FASOLO P., 1976. Ultrastuctural features of a vesicular-arbuscular mycorrhiza. 6th Europ. Cong. Elec. Micr., Jerusalem, 492-494.

SCANNERINI S., BONFANTE-FASOLO P., 1977. Unusual plastids in an endomycorrhizal root. Can. J. Bot., 55, 2471-2474.

SCANNERINI S., BONFANTE-FASOLO P., 1979. Ultrastructural cytochemical demonstration of polysaccharides and proteins within the host-arbuscule interfacial matrix in an endomycorrhiza. New Phytol., 83, 87-94.

SCANNERINI S., BONFANTE-FASOLO P., 1982. Données actuelles sur la cytologie des mycorhizes. Les colloques de l'INRA. Les mycorhizes, partie intégrante de la plante: Biologie et perspectives d'utilisation, 13, 25-40.

SCANNERINI S., BONFANTE-FASOLO P., 1983. Comparative ultrastructural analysis of mycorrhizal associations. Can. J. Bot., 61, 917-943.

SERRIGNY J., 1985. Synthèse mycorhizienne in vitro: étude cytologique comparée entre deux mycorhizes naturelles et artificielles et leur champignon symbiote isolé. Thèse de IIIe Cycle, Université de Nancy I, 70 pages.

SERRIGNY J., DEXHEIMER J., 1985. Etude ultrastructurale des endomycorhizes d'une Orchidée tropicale: *Epidendrum ibaguense* II. Localisation des ATPases et des nucléosides diphosphatases. Cytologia, 50, 779-788.

SITTON D., WEST C.A., 1975. Casbene: an antifungal diterpene produced in cell-free extracts of *Ricinus communis* seedlings. Phytochem., 14, 1921-1925.

SMITH S.E., GIANINAZZI-PEARSON V., 1988. interactions between symbionts in Physiological vesicular-arbuscular mycorrhizal plants. Ann. Rev. Plant Physiol. Mol. Biol., 39, 221-244. STRULLU D.G., 1976. Recherches de Biologie et de Microbiologie forestières. Etude des relations nutrition-développement et cytologie des mycorhizes chez le Douglas (Pseudotsuga menziesii Mirb.) et les Abiétacées, Thèse de Doctorat d'état, Université de Rennes, 291 pages. STRULLU D.G., 1978. Histologie et cytologie des endomycorhizes. Physiol. Vég., 16, 657-669. STRULLU D.G., 1982. L'association mycorhizienne. Acad. d'agriculture de France, séance du 17 février 82, 344-360. STRULLU D.G., 1985. "Les mycorhizes". Encyclopedia of plant anatomy, Begründ. von K. Linsbauer, Band XIII, 1-198. STRULLU D.G., 1986. Vers un modéle unifié de fonctionnement des symbioses mycorhiziennes. Physiol. vég., 24, 219-225. STRULLU D.G., GOURRET J.P., 1974. Ultrastructure et évolution du champignon symbiotique des racines de Dactylorchis maculata (L.) Verm. J. Microscopie, 20, 285-294. STRULLU D.G., GOURRET J.P., GARREC J.P., 1981 a. Microanalyse des granules vacuolaires des ectomycorhizes, endomycorhizes et endomycothalles. Physiol. Vég., 19, 367-378. STRULLU D.G., GOURRET J.P., GARREC J.P., FOURCY A., 1981 b. Ultrastructure and electron-probe microanalysis of metachromatic vacuolar granules occuring in *Taxus* mycorrhizas. theNew Phytol., 87, 537-545. STRULLU D.G., GRELLIER B., ROMAND C., GARREC J.P., 1985. Sur le modèle unifié de fonctionement des mycorhizes: synthèse in vitro de granules métachromatiques vacuolaires. Actes 1er Symp. Europ. Mycor., Dijon. Eds GIANINAZZI-PEARSON V., GIANINAZZI S., INRA, 441-444. SWARD R.J., 1978.

Infection of Australian Heathland plants by *Gigaspora margarita* (a vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus). Aust. J. Bot., 26, 253-264. SWIFT J.A., 1968. The electron histochemistry of cystine containing proteins in thin transverse sections of human hair. J. Roy. Mic. Soc., 88, 449-460. THIERY J.P., 1967. Mise en évidence des polysaccharides sur coupes fines en microscopie électronique. J. Micros., 6, 987-1017. TOTH R., MILLER R.M., 1984. Dynamics of arbuscule development and degeneration in a Zea mays mycorrhiza. Amer. J. Bot., 71, 449-460. VALENTINES R.C., 1961. Contrast enhancement in the electron microscopy of viruses. Adv. Vir. Res., 8, 287. VIAN B., ROLAND J.C., 1972. Différenciation des membranes et renouvellement du plasmalemme dans les phénomènes de sécrétions végétales. J. Microsc., 13, 119-136. WALKER G.P., POWELL C.L., 1979. Vesicular-arbuscular mycorrhizae in white clover. A scanning electron microscope and X-ray microanalytical study. N. Z. J. Bot., 17, 55-59. WHITE J.A., BROWN M.F., 1979. Ultrastructure and X-ray analysis of phosphorus granules in a vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus. Can. J. Bot., 57, 2812-2818. WOOLHOUSE H.W., 1975. Membrane structure and transport problems considered in relation to phosphorus and carbohydrate movements and the regulation of endotrophic mycorrhizal associations. In: "Endomycorrhizas", Eds. SANDERS F.E.T., MOSSE B., TINKER P.B., Academic Press, London-New York, 209-239. YAMAZAKI M., HAYAISHI O., 1968. Allosteric properties of nucleoside diphosphatase and its identity with thiamine pyrophosphatase. J. Biol. chem., 243, 2934-2942. YAWNEY W.J., SCHULTZ R.C., 1990. Anatomy of a vesicular-arbuscular endomycorrhizal symbiosis between sugar mapple (Acer saccharum Marsh.) and Glomus etunicatum BECKER & GERDEMANN. New Phytol., 114, 47-57. ZAAR K., SCHNEPF E., 1969.

Membranfluss und Nucleosid-diphosphatase Reaktion in Wurzelhaaren von *Lepidium sativum*. Planta, 88, 224-232. ZERBAN H., WERZ G., 1975. Localization of nucleoside diphosphatases and thiamine pyrophosphatase in various stages of the life cycle of green algae Acetabularia cliftonii and Acetabularia mediterranea. Cytobiologie, 12, 13-27.

.

## UNIVERSITE DE NANCY I

NOM DE L'ETUDIANT : JEANMAIRE CHRISTINE

NATURE DE LA THESE : DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE NANCY I EN BIOLOGIE VEGETALE ET FORESTIERE



### VU, APPROUVE ET PERMIS D'IMPRIMER

NANCY, le - 1 FEV. 1991 ~ 45

LE PRESIDENT DE L'UNIVERSITE DE NANCY I



### FTUDE CYTOPHYSIOLOGIQUE DES MYCORHIZES A VESICULES ET ARBUSCULES. APPROCHE ULTRASTRUCTURALE ET FONCTIONNELLE.

Ce travail concerne l'étude ultrastructurale et fonctionnelle des associations symbiotiques endomycorhiziennes à vésicules et arbuscules. Il comprend deux volets principaux:

- d'une part, l'étude de la mycorhization, en conditions contrôlées, d'essences ligneuses, par des Endogonacées. Nous nous sommes intéressé à l'ultrastructure des mycorhizes VA de deux Rosacées ligneuses, le merisier et le pommier, et d'une Bignoniacée, le catalpa. Pour ces essences, nous avons réalisé une étude ultrastructurale et cytochimique des associations.

La pénétration d'un champignon endomycorhizien dans une cellule corticale s'effectue à partir d'une ramification latérale d'une hyphe intercellulaire. La perforation de la paroi de la cellule-hôte ferait appel tout d'abord à une attaque enzymatique très localisée, modifiant la structure et la résistance de la paroi, puis à une poussée mécanique entraînant la rupture de la paroi affaiblie." L'envahissement d'une cellule corticale par l'endophyte induit de profondes modifications dans l'organisation de la cellule-hôte: accroissement du volume cytoplasmique, regression du volume vacuolaire, augmentation du nombre des mitochondries, modification du système plastidial, développement du réticulum endoplasmique et contacts entre ses travées et la existence de membrane périsymbionte. Pendant la phase de dégénérescence de l'arbuscule, la cellule libère des matériaux résultant de la destruction du cytoplasme. Ils pourraient être détournés par le partenaire fongique, au niveau du réseau d'hyphes intercellulaires bien développé dans les parties agées de la mycorhize.

Des rejets de merisiers prélevés dans la nature ont également été observés. Une étude du statut mycorhizien de ces plants ainsi qu'un suivi des mycorhizes au cours des saisons a été réalisé. Quelle que soit l'époque du prélévement, nous avons toujours observé la présence des mycorhizes à vésicules et arbuscules. Mais l'organisation de ces mycorhizes VA est inhabituelle, puisqu'il y aurait à la fois des structures endomycorhiziennes et un pseudoréseau de Hartig.

- d'autre part, la localisation au niveau ultrastructurale d'activités enzymatiques qui semblent jouer un rôle important dans les échanges entre les partenaires de la symbiose.

Nous nous sommes intéressée aux activités nucléosides diphosphatasiques et glucose-6-phosphatasiques qui sont impliquées dans le transfert de sucres de la cellule-hôte vers le champignon, ainsi qu'aux activités phosphatasiques alcalines qui interviennent dans le transfert du phosphate de la vacuole au cytoplasme fongique.

Ces études ultrastructurales et cytoenzymologiques nous permettent de proposer, en conclusion de ce travail, un schéma fonctionnel des mycorhizes à vésicules et arbuscules.

<u>Mots clés:</u> Mycorhizes à vésicules et arbuscules, merisier, pommier, catalpa, suivi saisonnier, approche fonctionnelle, nucléosides diphosphatases, glucose-6-phosphatase, phosphatases alcalines.