

# Contribution de la cytologie à l'étude des mécanismes de défense des plantes aux attaques parasitaires

M. NICOLE<sup>(1)</sup>, B. BOHER<sup>(1)</sup>, C. VALETTE<sup>(2)</sup>, C. MARTINEZ<sup>(1)</sup>, P.-A. CALATAYUD<sup>(3)</sup>, K. KPEMOUA<sup>(1)</sup>, C. DAAYF<sup>(4)</sup>, J.-F. DANIEL<sup>(1)</sup>, E. BRESSON<sup>(1)</sup>, J.-L. SARAH<sup>(2)</sup>, C. ANDARY<sup>(5)</sup>, J.-P. GEIGER<sup>(1)</sup>

(1) ORSTOM, laboratoire de phytopathologie, BP 5045, 34032 Montpellier, France.

(2) CIRAD, laboratoire de nématologie, BP 5035, 34032 Montpellier, France.

(3) ORSTOM, laboratoire des insectes nuisibles (LIN), BP 5045, 34032 Montpellier, France.

(4) Centre de recherche en horticulture, université de Laval, GIK7P4, Québec, Canada.

(5) Faculté de pharmacie, université de Montpellier 1, laboratoire de botanique et phytochimie, 34060 Montpellier, France.

L'un des défis actuels de la pathologie végétale réside dans la maîtrise des techniques de transfert de gènes de résistance aux maladies dans la perspective de disposer de variétés de plantes susceptibles de mieux résister à la pression parasitaire ambiante. Si le concept de transgénose chez les plantes est largement développé au plan expérimental (BROGLIE *et al.*, 1991 ; SAUVION *et al.*, 1995), son application à grande échelle demeure, pour le moment, problématique par rapport aux perspectives envisagées (MICHELMORE, 1995). Dans ce contexte, il paraît nécessaire de conforter les recherches sur le fonctionnement de ces gènes de résistance et des gènes de défense des plantes, incluant l'étude des mécanismes de leur régulation et du rôle des protéines pour lesquelles ils codent (LINDSAY *et al.*, 1993). Les techniques de biologie moléculaire associées à celle de la biochimie ont largement favorisé la compréhension de certains mécanismes de défense des végétaux aux agressions biotiques. Mais les progrès récents de la microscopie permettent aux disciplines telles que l'histologie et la cytologie de contribuer efficacement à la connaissance des réponses des plantes aux maladies parasitaires (BENHAMOU, 1993 ; NICOLE et GIANINAZZI-PEARSON, 1996). C'est ainsi que la cytologie moléculaire facilite la localisation spatio-temporelle de molécules synthétisées par les plantes et impliquées dans leur stratégie de défense face aux attaques microbiennes.

Dans la présente synthèse, on se propose de montrer l'apport de l'histopathologie à la compréhension de ces mécanismes à la fois à l'échelle tissulaire, cellulaire et moléculaire. Les photographies rapportées dans ce chapitre ont été acquises sur la base de recherches réalisées sur les modèles suivants : Hévéa-champignon (*Rigidoporus lignosus*), manioc-bactérie (*Xanthomonas campestris* pv. *manihotis*), manioc-cochenille, cotonnier-champignon (*Verticillium dahliae* et *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum*), cotonnier-bactérie (*Xanthomonas campestris* pv. *malvacearum*) et bananier-nématode (*Radopholus similis*).

## L'examen microscopique à l'échelle tissulaire

L'observation au microscope photonique d'un matériel végétal infecté permet une analyse à l'échelle histologique d'une situation parasitaire donnée. Associé aux techniques conventionnelles de coloration des constituants cellulaires (JENSEN, 1962), un tel examen rend compte d'événements intéressants plusieurs compartiments tissulaires. Dans le cas des maladies racinaires d'essences ligneuses causées par

des champignons agents de pourridés, il n'est pas rare de constater la mise en place de tissus lignifiés, néodifférenciés résultant de la stimulation d'activités cambiales (NICOLE *et al.*, 1991 et 1992). Le cambium libéro-ligneux, de même que l'assise génératrice subéro-phellodermique, peut ainsi être sollicité au cours de ces mécanismes de différenciation cellulaire (RIOUX et BIGGS, 1992). Les phénomènes de néogenèse tissulaire impliquent une activation de la biosynthèse des composés pariétaux dont des polysaccharides, des protéines, la lignine et la subérine impliqués dans le renforcement des barrières préformées (PETRINI et OUELLETTE, 1994). Ce mécanisme contribue à la tolérance des arbres aux agressions par les champignons en compartimentant les zones tissulaires infectées, phénomène qui se traduit dans le cas des maladies racinaires par la mise en place d'un nouveau système racinaire (SHIGO, 1984).

Une analyse similaire a été réalisée chez le manioc infecté par *Xanthomonas campestris* pv. *manihotis*, chez lequel la mise en place d'assises cicatricielles n'a été observée que dans les variétés tolérantes au parasite (KPEMOUA *et al.*, 1996).

En cas d'infection, la stimulation de la production de composés phénoliques représente une réponse spécifique mais générale des plantes. L'accumulation de phénols peut néanmoins caractériser une interaction différentielle comme dans l'exemple de la bactériose du cotonnier causée par *X. campestris* pv. *malvacearum*. Pour ce modèle, au cours d'une interaction incompatible, les plantes résistantes produisent des composés de type flavonoïde détectés histochimiquement dans les portions de mésophylle contaminé par la bactérie (DAI *et al.*, 1996). En revanche, dans les plants sensibles, l'infection généralisée à l'ensemble de la feuille ne déclenche pas une telle accumulation. La recherche d'activités enzymatiques associées à la production de flavonoïdes a révélé une intense activité peroxydase dans les plants résistants, apparaissant plusieurs heures avant l'accumulation de composés phénoliques. La résistance du cotonnier est fortement liée à la synthèse de plusieurs types de molécules incluant les phénols, les peroxydases et les terpénoïdes (ESSENBERG et PIERCE, 1994), toutes détectables par des techniques simples d'histochimie. Après extraction de certains de ces composés, des tests de toxicité ont permis de leur attribuer *in vitro* une activité antimicrobienne, autorisant leur classement dans le groupe des phytoalexines.

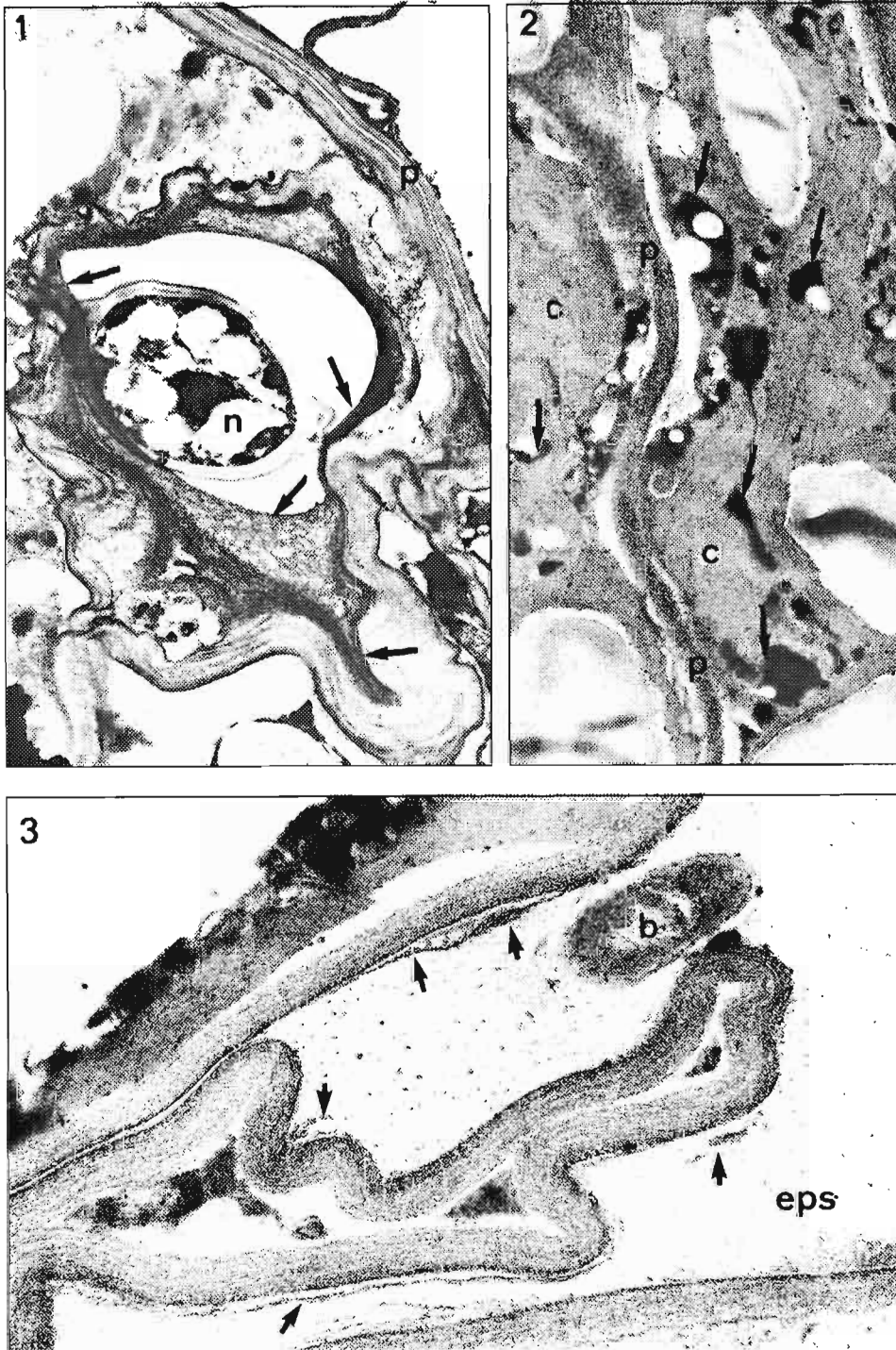
## L'examen microscopique à l'échelle cellulaire

Les réactions de défense des plantes se traduisent par des perturbations cellulaires importantes obser-

vables à l'échelle ultrastructurale. L'application des différentes techniques de microscopie électronique dans le domaine de la pathologie végétale permet ainsi d'affiner l'examen histologique en élargissant l'observation aux compartiments de la cellule (HALL et HAWES, 1991). Ainsi, la paroi constitue le siège privilégié de nombreuses réponses de la plante infectée, en ayant pour effet de renforcer cette barrière préexistante. Un enrichissement en protéines, en polysaccharides ou en polyphénols a ainsi été caractérisé dans les parois cellulaires de plantes contaminées. L'augmentation de la densité en électrons des parois des cellules de racines de bananier attaquées par le nématode migrateur *Radopholus similis* a pu être associée à l'imprégnation de ces parois par des flavonoïdes préalablement détectés par voie histo-chimique (VALETTE *et al.*, 1996) (figure 1). Dans les feuilles de cotonnier infectées par *X. campestris* pv. *malvacearum*, l'accumulation de flavonoïdes dans les cellules du mésophylle se caractérise sur le plan cytologique par la présence de globules denses aux électrons qui sont produits dans le cytoplasme (figure 2) avant de se concentrer dans les parois et dans la lamelle moyenne des cellules nécrotiques (figure 3) (DAI *et al.*, 1996). En raison des capacités des *Xanthomonas* à hydrolyser les pectines des lamelles moyennes (BOHER *et al.*, 1995), il est logique de suggérer que *X. campestris* pv. *malvacearum* se trouve confronté à des produits de dégradation de la pectine renfermant des molécules potentiellement bactéricides.

Dans le cas des maladies vasculaires, il est généralement admis que la colonisation de la plante repose sur le succès ou l'échec de l'expression de gènes de défense, d'une part, durant la colonisation des tissus corticaux et, d'autre part, durant l'installation et le développement du parasite dans le système vasculaire de la plante (BECKMAN, 1987). Au cours de la phase corticale, peu de parasites vasculaires fongiques ou bactériens sont freinés par les réactions différenciées par la plante pour les contrer, malgré l'efficacité potentielle de barrières structurales ou chimiques constitutives. C'est dans l'environnement des tissus vasculaires que le système défensif de la plante parvient à ralentir, voire à bloquer, la progression du parasite. Le transport des micro-organismes par les flux hydriques des vaisseaux accentue d'autant le risque de contamination systémique, imposant à la plante de réagir rapidement à la présence du parasite. C'est l'ensemble des parenchymes, paravasculaire et phloémique, qui est impliqué dans cette course contre la montre, qui va ainsi déterminer le niveau de résistance de l'hôte à la maladie.

Un groupe de molécules a été particulièrement étudié dans le cadre des mécanismes de résistance du cotonnier aux maladies vasculaires d'origine fongique. En effet, une étude histo-chimique et



**Figure 1.** *Ol* de racines de bananier infectées par le nématode *Radopholus similis*. Le nématode (n) est localisé dans un espace intercellulaire du parenchyme cortical d'une racine d'une variété tolérante. La lamelle moyenne autour du parasite présente une densité importante aux électrons (flèches), révélant l'accumulation de composés osmiophiles et identifiés comme des flavonoïdes par les tests histochimiques, (p : paroi cellulaire de l'endoderme) (x 8 000).

**Figure 2.** Observation en microscopie électronique de cotylédons de cotonnier résistant infectés par *Xanthomonas campestris* pv. *malvacearum*. Les cellules voisines de la nécrose typique de la réaction hypersensible contiennent

osmiophiles (flèches) identifiés par les techniques histochimiques comme des flavonoïdes, (p : paroi cellulaire), (x 28 000).

**Figure 3.** Observation en microscopie électronique de cotylédons de cotonnier résistant infectés par *Xanthomonas campestris* pv. *malvacearum*. La bactérie (b) localisée dans les espaces intercellulaires du mésophylle cotylédonnaire produit des exopolysaccharides en grande quantité (eps). Des composés de types flavonoïdes denses aux électrons sont localisés dans le cytoplasme coagulé des cellules parenchymateuses et dans la lamelle moyenne, dont des fragments se détachent et s'accumulent dans les eps bactériens (têtes de flèches), (x 43 500).

biochimique a démontré que certains métabolites secondaires appartenant aux terpénoïdes possédaient une activité antifongique à l'égard de *Verticillium dahliae*, agent de la verticilliose (BELL, 1992 ; MACE *et al.*, 1989). Une analyse similaire réalisée conjointement à l'observation ultrastructurale a montré que ces terpénoïdes sont produits dans les cellules parenchymateuses du phloème et du xylème puis excrétés dans l'espace paramural d'abord et les vaisseaux du xylème, ensuite (figure 4). Or, c'est dans ces vaisseaux que le champignon se développe pour coloniser la plante entière. Ainsi, dans les plantes tolérantes ou résistantes à la verticilliose, il a été observé que ces composés tapissaient la paroi du champignon dès les premiers jours de l'infection (figure 5). Un examen attentif révèle une désorganisation des systèmes endomembranaires des hyphes mycéliennes, traduisant un effet cytotoxique de ces molécules (DAAYF *et al.*, 1996) (figure 6).

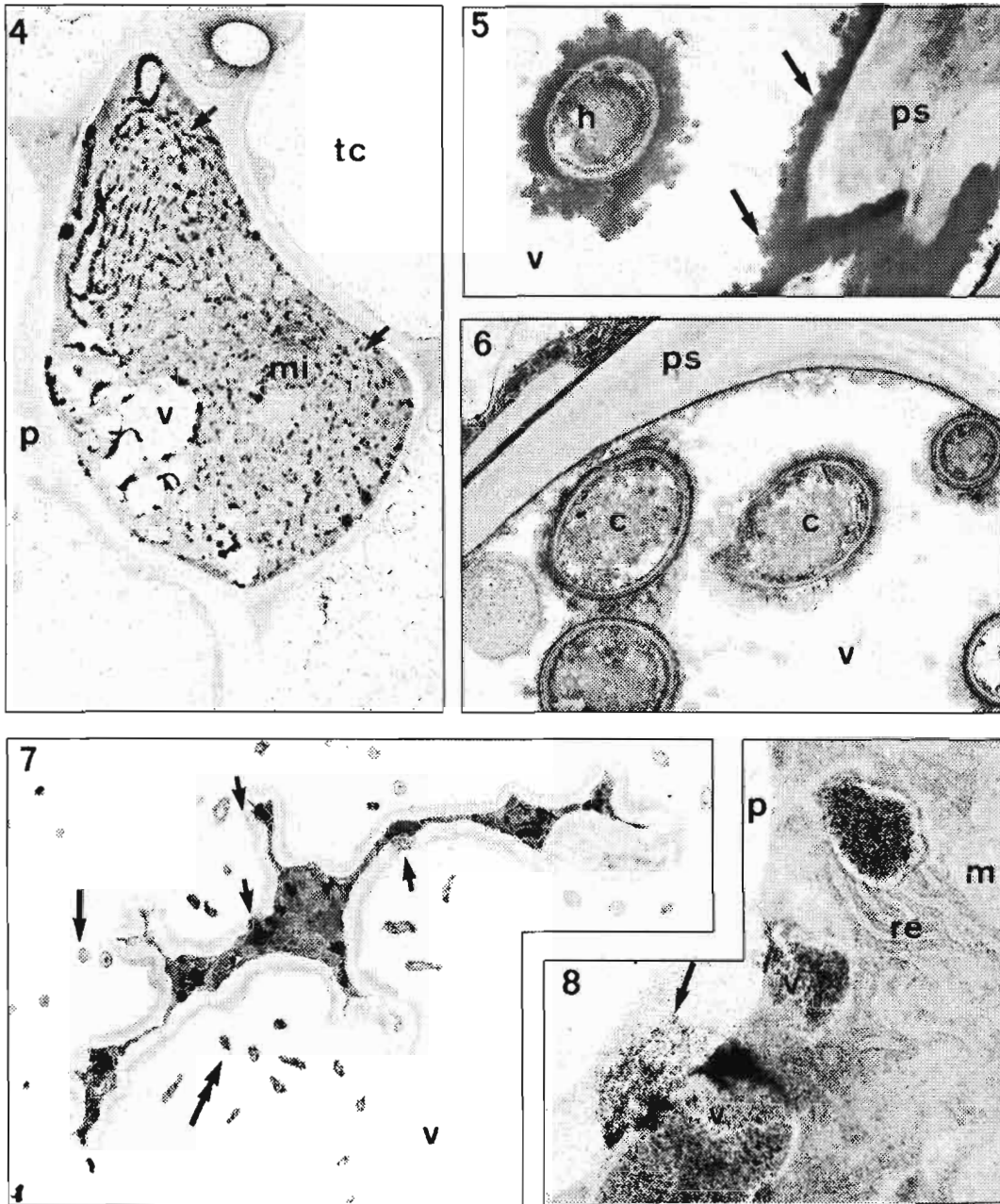
Dans le modèle manioc-*X. campestris* pv. *manihotis*, des réactions identiques ont été observées, aussi bien dans les plantes de la variété sensible que dans celles de la variété résistante. Sur cette dernière cependant, elles apparaissent plus précocement que sur la plante sensible et avec une intensité supérieure. A cet égard, des comptages comparatifs de vaisseaux contaminés, de cordons bactériens intercellulaires, de cellules produisant des composés phénoliques et de thyllles dans les vaisseaux ont permis de mieux apprécier l'impact de ces réponses sur le développement bactérien. Durant la phase vasculaire, la description des réponses de la plante révèle l'existence de différences significatives pouvant expliquer certains aspects de la résistance du manioc à la bactériose (KPEMOUA *et al.*, 1996). Ces réactions intéressent entre autres les modifications cellulaires de certains thyllles. Le thyllle est un moyen de défense qui permet, dans certains cas, de contenir localement les micro-organismes dans les vaisseaux contaminés, même s'il contribue également à ralentir le transfert de l'eau dans la plante. Leur production a largement été démontrée dans le cas de trachéomycoses (OUELLETTE et RIOUX, 1992 ; RIOUX *et al.*, 1995) et leur participation à la résistance à ces maladies a été clairement établie sur le cotonnier infecté par *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* (BECKMAN, 1987) et sur le bananier infecté par *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (VANDERMOLEN *et al.*, 1987). Dans le manioc infecté par *X. campestris* pv. *manihotis*, les observations ultrastructurales ont montré que certains des thyllles différenciés par la variété résistante subissaient une évolution morphologique non observée dans les plants infectés des variétés sensibles. En effet, ces thyllles prennent un aspect digité par comparaison à la forme globuleuse des thyllles produits dans les variétés sensibles contaminées (figure 7). Cette différenciation est associée à une désorganisation de leur contenu cellulaire. Avant le stade ultime du collapsus, le cytoplasme de

ces thyllles subit une modification profonde caractérisée par l'augmentation du nombre des organites, une augmentation de sa densité électronique et par l'apparition de vésicules dont le contenu, très osmophile, se déverse d'abord dans l'espace périplasmique, imprègne ensuite la paroi cellulosique et la lamelle moyenne et s'exclue enfin dans la lumière des vaisseaux (figure 8). Certaines des bactéries localisées au voisinage des zones de sécrétion de ces thyllles en phase de déstabilisation montrent des signes de dégradation (figure 7). Ce mécanisme s'apparente à celui d'une sécrétion de composés, de nature probablement phénolique, qui pourraient avoir un effet bactéricide. L'abondance d'organites dans les cellules compagnes et les thyllles tels que mitochondries, réticulum endoplasmique et appareil de Golgi conforte l'existence d'un processus de sécrétion très actif. En outre, la présence de composés phénoliques dans les thyllles est à relier à la densité particulière du cytoplasme des cellules parenchymateuses compagnes dont ils sont issus. L'organisation de ces cellules de la variété résistante est en effet très différente de celle des cellules compagnes des plantes sensibles, suggérant que les thyllles différenciés par les cellules parenchymateuses compagnes du xylème de la variété de manioc résistante à la bactériose possèdent les capacités métaboliques pour accumuler et sécréter des composés possédant des propriétés bactériostatiques (KPEMOUA *et al.*, 1996).

L'observation en microscopie électronique permet donc de caractériser un certain nombre de réponses de la plante soumise à un traumatisme parasitaire. Cette approche complète parfaitement l'analyse histochimique en précisant l'aspect ultrastructural et la cytolocalisation des composés identifiés par les techniques de coloration. En revanche, l'examen cytologique conventionnel reste souvent insuffisant pour la caractérisation chimique de structures néodifférenciées à l'échelle ultracellulaire. Le développement récent de la cytologie moléculaire a ouvert de nouvelles voies de recherche, qui approfondissent d'autant notre connaissance du rôle des produits des gènes de défense dans les stratégies élaborées par les plantes pour se protéger des infections.

## L'examen microscopique à l'échelle moléculaire

La cytologie moléculaire fait appel aux techniques de marquage des molécules à l'aide de sondes spécifiques. En raison de leur haute spécificité, elles sont considérées comme des outils particulièrement puissants, pour l'étude spatio-temporelle des produits des gènes. Ces sondes, couplées à des marqueurs



**Figure 4.** Observation en microscopie électronique de racines de cotonnier tolérant à la verticilliose. Dans le système vasculaire, des cellules parenchymateuses du phloème et du xylème produisent des substances denses aux électrons identifiées en histochimie comme des composés terpénoïdiques. Ces molécules sont localisées dans le réticulum endoplasmique (têtes de flèches), les vacuoles (v) et au voisinage des mitochondries (mi), (p : paroi cellulaire, tc : tube criblé du phloème), (x 11 000).

**Figure 5.** Observation en microscopie électronique de racines de cotonnier tolérant à la verticilliose. Les composés terpéniques denses aux électrons s'accumulent dans les vaisseaux (v), tapissant la paroi des hyphes fongiques (h) et la paroi secondaire des cellules (ps, flèches), (x 26 000).

**Figure 6.** Observation en microscopie électronique de racines de cotonnier tolérant à la verticilliose. L'impact des composés toxiques produits par les racines en réponse à

l'infection par *Verticillium* consiste en une désorganisation du cytoplasme des hyphes (c) qui se traduit par une dégradation des systèmes membranaires, (ps : paroi secondaire du vaisseau v), (x 21 000).

**Figure 7.** Observation en microscopie électronique de feuilles de manioc résistant infectées par *Xanthomonas campestris* pv. *manihotis*. Les thyllles digités au cytoplasme, très dense aux électrons, renferment des vésicules qui sécrètent des composés (têtes de flèches) dans la lumière du vaisseau (v). Des bactéries vivantes (doubles flèches) et mortes (flèches) sont visibles près du thyllle, (x 5 000).

**Figure 8.** Observation en microscopie électronique de feuilles de manioc résistant infectées par *Xanthomonas campestris* pv. *manihotis*. Agrandissement de la zone encadrée de la figure 7 montrant les vésicules (v) qui relarguent leur contenu osmiophile (flèches) dans la paroi (p) et la lumière du vaisseau (v). Remarquez le nombre important de mitochondries (m) et le réseau dense du réticulum (re), (x 40 000).

facilement détectables en microscopie tels que l'or colloïdal ou la fluorescéine, entre autres, permettent la cytolocalisation précise et fiable d'une très grande variété de molécules incluant des sucres, des polysaccharides, des protéines, des composés phénoliques, des lipides et des acides nucléiques (CHAMBERLAND, 1994).

Les anticorps, monoclonaux ou polyclonaux, représentent certainement le type de sonde le plus largement utilisé dans l'étude des réactions de défense des plantes (BENHAMOU, 1993), à condition d'assurer une préparation adéquate des tissus végétaux sans trop altérer les sites antigéniques recherchés. La distribution des HRGP (hydroxyproline-rich glycoprotein) a ainsi été suivie au cours de l'infection de racines de tomates par *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*, démontrant une production supérieure et une localisation plus large de cette glycoprotéine dans les plantes résistantes (BENHAMOU *et al.*, 1990). Ces HRGP ont été visualisées dans les espaces intercellulaires et les parois primaires. Des protéines enzymatiques produites par la plante en réponse aux infections fongiques ont de même été immunocyto-localisées ; l'exemple le plus connu concerne les chitinases et les glucanases. Leur immunolocalisation *in planta* a démontré leur implication respective dans la dégradation de la chitine et des  $\beta$ -1,3 glucanes des parois fongiques (BENHAMOU et ASSELIN, 1992). Conjointement à l'immunocytochimie de protéines enzymatiques, la recherche d'activité enzymatique permet d'associer *in situ* la localisation d'une enzyme à son activité (HALL et HAWES, 1991).

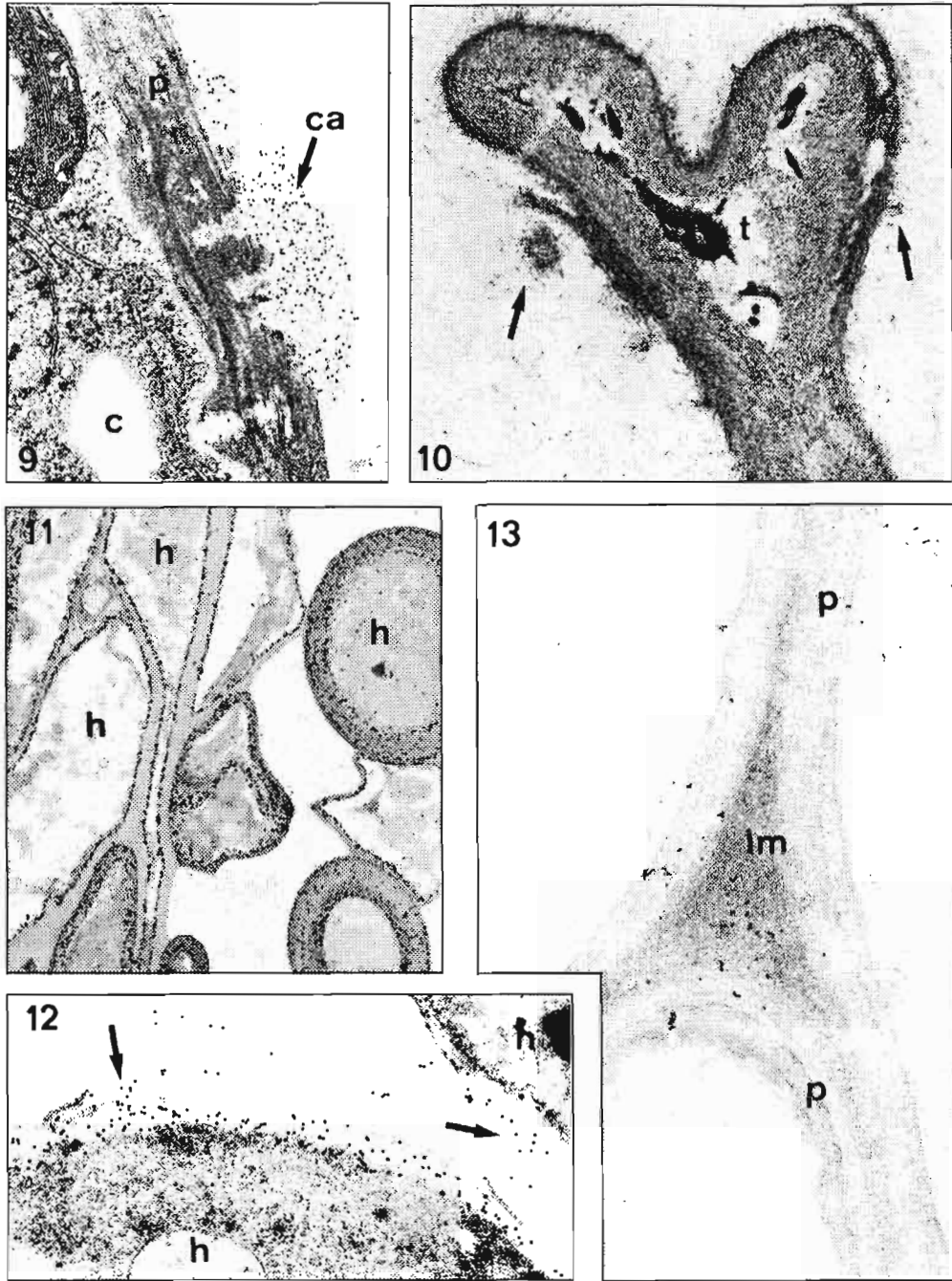
Les propriétés immunogènes des polysaccharides ont également été mises à profit pour confirmer le rôle de certains de ces polymères dans la résistance des plantes aux agressions microbiennes. L'activation de la synthèse de callose a ainsi été confirmée sur les plantes ayant subi une infection parasitaire. Si les dépôts de callose dans les cellules ne constituent pas en-soi une réaction de défense spécifique, ils interviennent néanmoins de manière systématique lors d'un traumatisme abiotique ou biotique. Ils ont pu être détectés dans le cas des maladies d'origine bactérienne (KPEMOUA *et al.*, 1996), fongique (DAAYF *et al.*, 1996), virale (PETERSCHMITT, non publié) ainsi que dans le cas d'attaques de nématodes (VALETTE *et al.*, 1996) et d'insectes (CALATAYUD *et al.*, 1996). Dans les tissus infectés, la callose est déposée dans les espaces intercellulaires, les papilles paramurales ou dans les parois cellulaires associées à une réorganisation de leur architecture (figure 9).

La production de pectine par les thylles durant leur différenciation en réponse aux infections par des maladies vasculaires a de même été immunocaractérisée dans les vaisseaux de manioc contaminés par *X. campestris* pv. *manihotis* (KPEMOUA *et al.*, 1996). Des fragments de composés pectiques se détachent

de la lamelle moyenne des thylles et s'accumulent dans la lumière des vaisseaux jusqu'à leur occlusion (figure 10). D'une manière générale, l'immunolocalisation des composés pectiques confirme les processus de dégradation des lamelles moyennes, qui conduit à la libération dans le compartiment apoplastique d'oligomères de pectine dont le rôle éliciteur des mécanismes de défense a déjà été décrit par ailleurs (RYAN et FARMER, 1991).

La cytolocalisation de mono- ou oligosaccharides peut être conduite en utilisant les lectines, glycoprotéines présentant une très forte affinité pour les sucres (BENHAMOU, 1989). La lectine de germe de blé (WGA, *Wheat germ agglutinin*) a ainsi été testée avec succès pour la localisation de la N-acétylglucosamine, monomère constitutif de la chitine des parois de champignons (figure 11) (NICOLE et BENHAMOU, 1991). Dans le cadre de l'étude des réactions de défense des racines de cotonnier infectées par *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum*, l'utilisation de cette lectine a montré que la paroi du champignon subissait de graves dommages dans les plantes plus tolérantes à l'infection suggérant l'intervention d'une chitinase dans le système défensif du cotonnier (figure 12). Une telle approche a par ailleurs confirmé la production de cette PR-protéine dans des plantes transgéniques pour le gène de la chitinase (BENHAMOU *et al.*, 1993).

L'application de la technique enzyme-or permet de localiser avec succès des substrats aussi diversifiés que les acides nucléiques, les lipides, les sucres ou les composés phénoliques (BENDAYAN, 1984 ; VIAN *et al.*, 1991). L'utilisation d'une laccase fongique, une ortho-diphénol oxydase, conjuguée à l'or colloïdal après purification de l'enzyme a permis de localiser la présence de composés phénoliques impliqués dans des réponses de plantes infectées, soit par des champignons (BENHAMOU *et al.*, 1994), soit par des bactéries (BOHER *et al.*, 1996). La stimulation du système défensif de tomates attaquées par *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* induit la formation et l'accumulation dans le parenchyme cortical racinaire de structures globulaires, dont certaines renferment des composés phénoliques indétectables par les techniques histo-chimiques conventionnelles (BENHAMOU *et al.*, 1994). Dans les parenchyms vasculaires de tiges de manioc résistant, le complexe laccase-or a confirmé l'imprégnation des espaces intercellulaires et des lamelles moyennes par des composés phénoliques (KPEMOUA *et al.*, 1996) (figure 13). De tels composés ont également été caractérisés dans des bactéries en dégénérescence au voisinage des thylles dans les vaisseaux contaminés du xylème. L'observation de ces tissus sous lumière ultra-violette confirme la présence de ces composés grâce à leur fluorescence naturelle.



**Figure 9.** Observation en microscopie électronique de racines de cotonnier tolérant à la verticilliose. Marquage de la callose après utilisation d'anticorps polyclonaux anti- $\beta$ -1,3-glucanes. Un dépôt de callose (ca) est visible dans l'espace paramural d'une cellule du phloème, (c : cellule phloémique ; p : paroi cellulaire), (x 27 000).

**Figure 10.** Observation en microscopie électronique de feuilles de manioc résistant infectées par *Xanthomonas campestris* pv. *manihotis*. Immunomarquage de la pectine avec des anticorps monoclonaux montrant la présence de fragments de lamelle moyenne (flèches) se détachant du thylle (t), (x 20 000).

**Figure 11.** Observation en microscopie électronique de racines d'*Hevea brasiliensis* infectées par le champignon *Rigidoporus lignosus*, agent de pourriture blanche. Marquage de la chitine fongique par la lectine de germe de blé conjuguée à l'or colloïdal.

Les particules d'or sont régulièrement distribuées sur la paroi des hyphes mycéliennes (h), (x 9 000).

**Figure 12.** Observation en microscopie électronique de racines de cotonnier infectées par le champignon *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum*. Marquage de la chitine fongique par la lectine de germe de blé conjuguée à l'or colloïdal. La présence de particules d'or (flèches) au voisinage de la paroi des filaments mycéliens (h) suggère une dégradation de la chitine pariétale avec libération d'oligomères de chitine, (x 26 000).

**Figure 13.** Observation en microscopie électronique de feuilles de manioc résistant infectées par *Xanthomonas campestris* pv. *manihotis*. Marquage des composés phénoliques par une enzyme (la laccase) conjuguée à l'or colloïdal. Les particules d'or sont localisées sur la lamelle moyenne (lm) et la paroi primaire (p), (x 24 000).

Si l'approche enzyme-or apparaît comme extrêmement séduisante, elle nécessite cependant un travail préalable et incontournable de purification de protéine, limitant *a priori* l'accessibilité à cette méthodologie.

Enfin, l'exposé de ces approches moléculaires ne saurait être complet si l'on n'évoquait les techniques d'hybridation *in situ*. Dans la problématique de l'identification des réactions de défense des plantes, elles apportent sans conteste des informations précieuses relatives à la cinétique de l'expression des gènes par la caractérisation des ARN messagers (BRANGEON, 1996), permettant ainsi d'affirmer les associations étroites pouvant exister entre les gènes de résistance et la présence plus ou moins précoce de certaines protéines. C'est le cas, notamment, des recherches portant sur les gènes impliqués dans la réaction hypersensible, manifestation cellulaire extrême de la résistance des plantes aux attaques microbiennes (GOODMAN et NOVACKY, 1994).

## Conclusion

Dans ce chapitre, nous nous sommes attachés à démontrer l'apport de la biologie cellulaire à la compréhension des mécanismes de résistance des plantes aux parasites. Les techniques modernes de la cytologie moléculaire permettent ainsi les opérations suivantes :

- suivre *in planta* le devenir d'une molécule au cours d'une interaction ;
- en préciser la distribution à l'échelle des tissus et de la cellule ;
- la visualiser par rapport aux sites d'infection et de localisation du parasite.

Aussi efficace que paraît cette approche, elle présente néanmoins un facteur limitant important qui réside dans la préservation du matériel végétal durant la préparation des échantillons pour l'observation microscopique. C'est particulièrement évident pour les étapes de fixation, pour lesquelles les techniques, fondées sur l'utilisation du froid (cryo-fixation) sous haute pression, évitent les artefacts possibles pouvant se produire lors de la fixation chimique.

Il faut, en outre, conserver à l'esprit que la microscopie génère l'information sous forme d'images qui, en elles-mêmes, ne constituent qu'un instantané d'une situation particulière. Dans une stratégie d'étude des interactions plante-parasite, elle occupe une place essentielle, à condition qu'elle s'insère dans un dispositif plus large comprenant des approches biochimiques, moléculaires, voire immunologiques. C'est vrai au plan fondamental pour une meilleure compréhension des mécanismes étudiés, c'est vrai aussi au plan technologique pour l'obten-

tion de ces outils performants que sont les sondes moléculaires.

## Références bibliographiques

- BECKMAN C.H., 1987. The nature of wilt diseases of plants. APS Press, St Paul, Etats-Unis, 175 p.
- BELL A.A., 1992. *Verticillium wilt*. In Cotton diseases. HILLOCKS J.H. (Ed.), CAB International, Wallingford, Grande-Bretagne, p. 87-126.
- BENDAYAN M., 1984. Enzymes-gold electron microscopic cytochemistry : a new affinity technique for the ultrastructural localization of macromolecules. Journal of Electron Microscopical Techniques 1 : 349-352.
- BENHAMOU N., 1989. Preparation and application of lectin-gold complexes. In Colloidal Gold. Principles, Methods, and Applications. HAYAT M.A. (Ed.), Academic Press, New York, Etats-Unis, p. 96-145.
- BENHAMOU N., 1993. Spatio-temporal regulation of defense genes : immunocytochemistry. In Mechanisms of Plant Defense Responses. FRITIG B. et LEGRAND M. (Eds), Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Pays-Bas, p. 221-235.
- BENHAMOU N., ASSELIN A., 1992. *In situ* immunocytochemical localization of plant proteins. In Methods in Plant Molecular Biology and Biotechnology. THOMPSON J.E. and GLICK B.R. (Eds), CRC Press, Londres, Grande-Bretagne, p. 128-141.
- BENHAMOU N., BROGLIE K., CHET I., BROGLIE R., 1993. Cytology of infection of 35S-bean chitinase transgenic canola plants by *Rhizoctonia solani*: cytochemical aspects of chitin breakdown *in vivo*. The Plant Journal 4 : 295-305.
- BENHAMOU N., LAFONTAINE P.-J., NICOLE M., 1994. Seed treatment with chitosan enhanced resistance to *Fusarium* crown and root rot in tomato plants. Phytopathology 12 : 1 432-1 444.
- BENHAMOU N., MAZAU, D., ESQUERRE-TUGUAYE M.-T., 1990. Immunogold localization of hydroxyproline-rich glycoproteins in tomato root cells infected by *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*, study of a compatible interaction. Phytopathology 80 : 163-173.
- BOHER B., KPAMOUA K., NICOLE M., LUISETTI J., GEIGER J.-P., 1995. Ultrastructure of interactions between cassava and *Xanthomonas campestris* pv. *manihotis* : Cytochemistry of cellulose and pectin degradation in a susceptible cultivar. Phytopathology 85 : 777-788.
- BOHER B., BROWN I., NICOLE M., KPAMOUA K., BONAS U., GEIGER J.-P., MANSFIELD J., 1996. Histology and cytochemistry of interactions between plants and *Xanthomonas*. In Histology, Ultrastructure and



- Molecular Cytology of Plant-Microorganism Interactions. NICOLE M. et GIANINAZI-PEARSON V. (Eds), Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Pays-Bas, p. 193-210.
- BRANGEON J., 1996. *In situ* hybridization to RNA in plant biology. *In* Histology, Ultrastructure and Molecular Cytology of Plant-Microorganism Interactions. NICOLE M. and GIANINAZI-PEARSON V. (Eds), Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Pays-Bas, p. 21-42.
- BROGLIE K., CHET I., HOLLIDAY M., CRESSMAN R., BIDDLE P., KNOWLTON S., MAUVALS C.J., BROGLIE R., 1991. Transgenic plants with enhanced resistance to the fungal pathogen *Rhizoctonia solani*. *Science* 254 : 1 194-1 197.
- CALATAYUD P.-A., BOHER B., NICOLE M., GEIGER J.-P., 1996. Interactions between cassava mealybug and cassava : cytochemical aspects of plant cell wall modifications. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, sous presse.
- CHAMBERLAND H., 1994. Gold labeling methods for the ultrastructural localization of host wall and pathogen components. *In* Host wall alterations by parasitic fungi. PETRINI O. and OUELLETTE G.B.O. (Eds), APS Press, St Paul, Etats-Unis, p. 1-12.
- DAAYF F., NICOLE M., BOHER B., PANDO A., GEIGER J.-P., 1996. Early defense reactions of cotton to *Verticillium dahliae*. *European Journal of Plant Pathology*, sous presse.
- DAI G.-H., NICOLE M., MARTINEZ C., BRESSON E., DANIEL J.-F., ANDARY C., GEIGER J.-P., sous presse. Histochemistry and ultrastructure of flavonoid accumulation during an incompatible interaction between *Xanthomonas campestris* pv. *malvacearum* (race 18) and cotton. *Planta*, sous presse.
- ESSENBERG M., PIERCE M., 1994. Sesquiterpenoid phytoalexins synthesized in cotton leaves and cotyledons during the hypersensitive response to *Xanthomonas campestris* pv. *malvacearum*. *In* Handbook of phytoalexin metabolism and action. DANIEL M. and PURKAYASTHA R.P. (Eds), Marcel DEKKER Inc., New York, Etats-Unis, p. 183-198.
- GOODMAN R.N., NOVACKY A.J., 1994. The hypersensitive reaction in plants to pathogens, a resistance phenomenon. APS Press, St Paul, Etats-Unis, 245 p.
- HALL J.L., HAWES C., 1991. Electron microscopy of plant cells. Academic Press, Londres, Grande-Bretagne, 466 p.
- JENSEN W.A., 1962. Botanical Histochemistry. Freeman and Company, San Francisco, Etats-Unis, 409 p.
- KPEMOUA K., BOHER B., NICOLE M., CALATAYUD P.-A., GEIGER J.-P., 1996. Cytochemistry of defense responses in cassava infected by *Xanthomonas campestris* pv. *manihotis*. *Canadian Journal of Microbiology*, sous presse.
- LINDSAY W.P., LAMB C.J., DIXON R.A., 1993. Microbial recognition and activation of plant defense systems. *Trends in Microbiology* 1 : 181-187.
- MACE M.E., STIPANOVIC R.D., BELL A.A., 1989. Histochemical localization of deoxyhemigossypol a phytoalexin in *Verticillium dahliae*-infected cotton stems. *New Phytologist* 111 : 229-232.
- MICHELMORE R., 1995. Molecular approaches to manipulation of disease resistance genes. *Annual Review of Phytopathology* 15 : 393-427.
- NICOLE M., BENHAMOU N., 1991. Ultrastructural localization of chitin in cell walls of *Rigidoporus lignosus*, the white root rot fungus of rubber trees. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 39 : 415-432.
- NICOLE M., GIANINAZI-PEARSON V., 1996. Histology, Ultrastructure and Molecular Cytology of Plant-Microorganism Interactions. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Pays-Bas, 270 p.
- NICOLE M., GEIGER J.-P., NANDRIS D., 1992. Defense mechanisms of angiosperm roots to fungal invasion. *In* Defense mechanisms of woody plants against fungi. BLANCHETTE R.A. and BIGGS A.R. (Eds), Springer Verlag, New York, Etats-Unis, Heidelberg, Allemagne, p. 181-206.
- NICOLE M., TOPPAN A., GEIGER J.-P., ROBY D., RIO B., NANDRIS D., 1991. Defense responses of *Hevea brasiliensis* to elicitors from root rot fungi. *Canadian Journal of Botany* 69 : 1 819-1 824.
- OUELLETTE G.B.O., RIOUX D., 1992. Anatomical and physiological aspects of resistance to Dutch elm disease. *In* Defense mechanisms of woody plants against fungi. BLANCHETTE R.A. et BIGGS A.R. (Eds), Springer Verlag, Berlin, Allemagne, p. 257-307.
- PETRINI O., OUELLETTE G.B.O., 1994. Host wall alterations by parasitic fungi. APS Press, St Paul, Etats-Unis, 159 p.
- RIOUX D., BIGGS A.R., 1994. Cell wall changes in host and non host systems : microscopic aspects. *In* Host wall alterations by parasitic fungi. PETRINI O. and OUELLETTE G.B.O. (Eds), APS Press, St Paul, Etats-Unis, p. 31-44.
- RIOUX D., CHAMBERLAND H., SIMARD M., OUELLETTE G.B., 1995. Suberized tyloses in trees : an ultrastructural and cytochemical study. *Planta* 196 : 125-140.
- RYAN C.A., FARMER E.E., 1991. Oligosaccharide signals in plants : a current assessment. *Annual Review of Physiological and Molecular Plant Biology* 42 : 651-674.
- SAUVION N., BONADE-BOTTINO M., JOUANIN L., RAHBE Y., 1995. Les plantes transgéniques résistantes aux insectes. INFO 2000, Bulletin d'information des zoologistes de l'INRA 10 : 3-13.
- SHIGO A.L., 1984. Compartmentalization : a conceptual framework for understanding how trees grow and defend themselves. *Annual Review of Phytopathology* 22 : 189-214.

VALETTE C., NICOLE M., SARAH J.-L., BOISSEAU M., BOHER B., FARGETTE M., GEIGER J.-P., 1996. Ultrastructure and cytochemistry of interactions between banana and the nematode *Radopholus similis*. *Fundamental and Applied Nematology*, sous presse.

VIAN B., NAIRN J., REID J., 1991. Enzyme-gold cytochemistry of seed xyloglucans using two xyloglucan specific hydrolases. Importance of prior deactivation of the enzymes. *Histochemical Journal* 23 : 116-124.

---

## Discussion

### Les flavonoïdes

Les flavonoïdes appartiennent au groupe des composés phénoliques. Certains sont constitutifs alors que d'autres sont induits après un traumatisme biotique ou abiotique. Parmi les fonctions multiples qu'elles occupent (reconnaissance, attractivité, stimulateurs de croissance), ces molécules peuvent également être impliquées dans le système défensif des végétaux comme signaux activateurs de gènes ou en tant que phytoalexines. Dans ce dernier cas, on a pu démontrer *in vitro* l'action antimicrobienne de certaines d'entre elles sur un grand nombre de micro-organismes (champignons, bactéries, nématodes...).

### Les sites de production des phytoalexines

Ils sont bien entendu synthétisés dans le cytoplasme des cellules de tissus infectés. Dans le cas du cotonnier infecté par les champignons vasculaires *Verticillium* ou *Fusarium*, ou par une bactérie foliaire, *Xanthomonas campestris* pv. *malvacearum*, deux sites de production des terpénoïdes dérivés du gossypol ont été mis en évidence sur le plan cellulaire : les cellules parenchymateuses du phloème et celles associées aux vaisseaux du xylème.

### Mise en évidence d'anthocyanes

Dans les modèles décrits, aucune production d'anthocyanes n'a été caractérisée, même si ces molécules sont connues pour intervenir dans d'autres modèles plantes-parasites.

### Tolérance et résistance des végétaux

Ces deux notions diffèrent dans leur définition. La tolérance est une notion essentiellement agronomique reposant sur des variations dans le rendement en fonction du degré de maladie, mais les anglophones utilisent également le terme de tolérance dans le cadre des interactions plantes-micro-organismes.

La résistance a un fondement génétique qui repose sur le concept gène pour gène, pour lequel le(s) gène(s) de résistance de la plante s'oppose(nt) à un gène d'avirulence du parasite.

Dans le cas d'une interaction incompatible, la résistance résulte de l'expression d'un ou de quelques

gènes ; elle se traduit par une réaction de type hypersensible (exemple : la bactériose du cotonnier). Ces gènes gouvernent l'activation de signaux impliqués dans la mise en place de la réaction hypersensible ou le déclenchement des réactions de défense. Dans le cas d'une interaction compatible, l'absence de ces gènes de résistance de la plante conduit à des degrés d'infection variables résultant de la manifestation essentielle de gènes de défense. Parmi ces derniers, citons ceux qui codent pour la synthèse de molécules impliquées dans le renforcement des parois cellulaires : lignine, subérine, callose, HRGP. Alors que d'autres codent pour la synthèse de protéines reliées à la pathogénèse (PR-protéines), telles les chitinases ou les glucanases, ou pour la production de composés phénoliques comme les flavonoïdes ou les dérivés cathéchiques. L'efficacité des réactions de défense varie en fonction de l'environnement, du cultivar et, surtout, des micro-organismes pathogènes, dont certains ont la capacité de contourner ces réponses.

Une bonne connaissance des mécanismes de résistance des plantes associée à la maîtrise des techniques de transgénèse permet de disposer de plantes transgéniques dans lesquelles ont été introduits des gènes de résistance à certains microbes (bactérie et champignon).

### Quel est le coût énergétique des mécanismes de défense pour la plante ?

La différenciation de réactions de défense sollicite plusieurs métabolismes, souvent au détriment des fonctions physiologiques essentielles de la plante (croissance, photosynthèse, respiration, reproduction, stockage de substances de réserve). La synthèse *de novo* de molécules antimicrobiennes ou la mise en place de mécanismes de cicatrisation exige une consommation d'énergie plus ou moins importante. Bien que le métabolisme primaire ne puisse être fondamentalement altéré dans une situation d'incompatibilité entre la plante et son micro-organisme pathogène, il a été démontré des détournements de transfert de flux intéressant des éléments comme le carbone et l'azote. Cependant, la production de métabolites secondaires (composés phénoliques et terpéniques, hormones de croissance...), impliqués dans la réponse de la plante à l'agression parasitaire, peut se traduire par une diminution de la biomasse végétale, une réduction des substances de réserve ou une diminution de l'efficacité des processus physiologiques.

D'une manière générale, il est difficile de quantifier de telles perturbations physiologiques en termes de consommation d'énergie car la plante cherche, dans la mesure du possible, à établir la situation d'équilibre énergétique la plus favorable à son développement.