

## CYTOCHIMIE DES POURRIDIES DE L'HEVEA

M. NICOLE\*, N. BENHAMOU\*\*, H. CHAMBERLAND\*,

J.P. GEIGER\*\*\* et G.B. OUELLETTE\*

\* ORSTOM/Forêts Canada, 1055 du PEPS,

Sainte Foy, G1V 4C7, Québec, Canada

\*\* Université Laval, FSAA, Département de Phytologie,

Sainte Foy, G1K 7P4, Québec Canada

\*\*\* ORSTOM, Laboratoire de Phytopathologie, BP 5045,

34000 Montpellier, France

**Resumé:** *Rigidoporus lignosus*, champignon basidiomycète agent du pourridié blanc, dispose d'enzymes impliquées dans la pourriture des racines d'*Hevea brasiliensis*. Les dégâts causés aux tissus de la plante se traduisent par une altération des parois des cellules. Une étude cytochimique a été menée récemment dans le but de compléter nos connaissances des mécanismes de ces maladies. L'utilisation de sondes moléculaires permet ainsi de mieux appréhender le rôle des enzymes fongiques dans la dégradation du bois et celui de la paroi fongique dans l'interaction arbre-champignon. Une exoglucanase conjuguée à l'or colloïdal permet la localisation des liaisons  $\beta$ -1-4-D glucanes des extrémités non réductrices de la cellulose. Son application aux coupes ultrafines de racines d'*Hévéa* infectés a montré que la cellulose est dégradée dès la pénétration des hyphes dans la plante, quelle que soit la nature des tissus colonisés par le champignon. Ces résultats suggèrent que les cellulases de *R. lignosus* jouent un rôle essentiel dans l'initiation de l'infection; elles interviendraient en outre au début de la dégradation des parois cellulaires lignifiées. Les laccases, polyphénols oxydases sécrétées par le parasite, sont impliquées dans la dégradation de la lignine. Le marquage immunocytochimique de ces enzymes dans le bois infecté a révélé que les laccases de *R. lignosus* ne se localisent ni dans le bois apparemment sain, ni dans les parois très dégradées. En revanche, elles pénètrent toutes les parois cellulaires de même que la lamelle moyenne en cours de pourrissement. Ceci suggère que la contribution de ces glycoprotéines à la dégradation de la lignine est limitée dans le temps mais non dans l'espace. Une lectine de blé (WGA) reconnaît spécifiquement la glucosamine, monomère constitutif de la chitine des parois fongiques. Le traitement de coupes par cette lectine, suivi de l'ovomucoïde-or, a montré que la chitine fongique est modifiée lorsque les hyphes pénètrent les parois des cellules hôtes et ce, vraisemblablement pour faciliter la sécrétion des enzymes de dégradation. Une altération de la chitine a également été observée durant la colonisation des racines. Cette altération se traduit, dans les cellules hôtes, par la libération d'oligosaccharides de chitine, éliciteurs potentiels de certaines réactions de défense de l'arbre à l'agression parasitaire.

**Abstract:** *Rigidosporus lignosus*, a basidiomycete fungus that causes white root rot, has enzymes that contribute to root rot in *Hevea brasiliensis*. Damage done to plant tissue leads to the deterioration of the cell walls. A cytochemical study was recently carried out to generate information on the mechanisms of this disease. Molecular probes can be used to better understand the role of fungal enzymes in the deterioration of wood and the fungal wall during tree-fungus interaction. Exoglucanase together with colloidal gold can be used to locate the  $\beta$ -1-4-D glucan bonds in the unaffected ends of the fiber. Applying it to ultrathin cuttings of the infected rubber plant root shows that the cellulose is decomposed as soon as the hyphae penetrates the plant, regardless of the nature of the tissue colonized by the fungus. These results suggest that the cellulase of *R. lignosis* plays an essential role in initiating infection. Furthermore, it also has an effect at the beginning of the degradation of the

*lignified cell walls. The laccase, polyphenol oxydase secreted by the parasites are involved in the lignin degradation. Immunocytochemical marking of this infected wood shows that the laccase of R. lignosus does not settle in apparently healthy wood, nor in excessively damaged walls. On the other hand, it penetrates all cell walls and the middle lamella during rot development. This suggests that the contribution of glycoproteins to the degradation of the lignin is limited in time, but not in space. A wheat lectin (WGA) specifically recognizes the glucosamine, the monomer that builds up in the chitin of the fungal walls. Cutting this lectin and the ovomucoid gold has shown that fungal chitin is modified when the hyphae penetrates the walls of the host cells, and that it very probably occurs to facilitate the secretion of the degradation enzymes. Chitin degradation was also observed during root colonization. In the host cells, this leads to the release of chitin oligosaccharides that potentially elicit certain defense reactions in trees subjected to heavy parasite attack.*

*Rigidoporus lignosus*, champignon basidiomycète agent du pourridié blanc, est responsable de la pourriture blanche des racines d'*Hevea brasiliensis* (Nandris *et al.* 1987), euphorbiacée cultivée pour sa production de latex. Les recherches antérieures sur les interactions hôtes-parasites (IHP), conduites tant au plan biochimique qu'à l'échelle cellulaire, ont mis en exergue certains mécanismes de l'agression des racines, de même que plusieurs réponses des arbres à l'infection.

Les hyphes mycéliennes pénètrent par les ouvertures naturelles de la racine, les blessures ou après digestion des parois cellulaires de l'assise peridermique (Nicole *et al.* 1986c, Nicole *et al.* 1987). La progression des hyphes dans les tissus racinaires se traduit par la dégradation des différents constituants des parois tels la subérine, la cellulose et la lignine (Nicole and Benhamou 1991a, Nicole *et al.* 1982, Nicole *et al.* 1987). L'altération de ces polymères résulte de l'activité d'enzymes fongiques extracellulaires (glycosidases et certaines oxydases) dont le rôle dans le processus de pourrissement est déterminant (Geiger *et al.* 1986a, Geiger *et al.* 1986b, Geiger *et al.* 1986d). L'aboutissement de la maladie conduit à l'arrêt de la production de latex (Nicole *et al.* 1982, Nicole *et al.* 1986b), économiquement préjudiciable aux plantations villageoises et industrielles.

Parmi les réactions de défense du système racinaire à l'infection, les barrières élaborées au niveau histologique (hyperplasie, néogénèse tissulaire, stimulation des cambiums...) et à l'échelle de la cellule (hypertrophie, épaissements pariétaux, subérification et lignification des parois, dépôts de callose...), de même que la stimulation d'une activité peroxydasique et la mise en place d'une lignine de défense constituent les réponses les plus significatives (Geiger *et al.* 1989, Nicole *et al.* 1986a, Nicole *et al.* 1992).

L'apparition récente des techniques de marquages à l'or colloïdal a ouvert de nouvelles perspectives dans l'étude, *in planta*, des IHP (Bendayan 1984, Benhamou 1989, Herman 1988, McFadden 1991) autorisant la localisation spécifique d'une, ou plusieurs, molécules à l'échelle de la cellule. Ces sondes moléculaires, appliquées au couple Hévée-*R. lignosus*, ont permis une meilleure compréhension des mécanismes de la biodégradation du bois (Nicole and Benhamou 1991a, Nicole *et al.* 1992), du comportement de la paroi fongique durant l'infection (Nicole and Benhamou 1991b) et du rôle potentiel de certaines molécules dans la mise en place des réactions de l'arbre (Nicole and Benhamou 1991b). Cet article constitue une

synthèse des données acquises au cours de l'étude cytochimique des pourridés de l'Hévéa. Il concerne particulièrement (i) la dégradation de la cellulose (ii) la localisation de la chitine de la paroi de *R. lignosus* durant la colonisation du système racinaire et (iii) l'immunolocalisation d'une laccase fongique impliquée dans la biodégradation du bois.

### MATERIEL ET METHODES

- **Infections artificielles des jeunes plants d'Hévéa:** Des plants d'Hévéa âgés de six mois environ ont été infectés par une souche de *R. lignosus* selon la méthode décrite par Nandris *et al.* (1983).

- **Purification de la laccase fongique:** La laccase L1 de *R. lignosus* a été produite *in vitro* et purifiée selon le protocole décrit par Geiger *et al.* (1986c). La pureté de l'enzyme a été vérifiée en électrophorèse sur gel d'acrylamide (Geiger *et al.* 1986c).

- **Observations ultrastructurales:** Des fragments de racines saines ou infectées artificiellement, prélevées à des temps variables, ont été préparés pour l'observation en microscopie électronique à transmission (MET) selon le protocole rapporté par Nicole *et al.* (1987). Les coupes ultrafines, contrastées à l'acétate d'uranyle et au citrate de plomb, ont été observées au microscope Jeol 1200X (Département de Phytologie, Université de Laval). Des blocs de bois stériles,ensemencés par *R. lignosus* (Geiger *et al.* 1986d) afin de localiser la production des laccases, ont été préparés comme précédemment décrit pour l'observation en MET.

- **Techniques cytochimiques**

- a. **Mise en évidence de la cellulose des parois des cellules hôtes:** Une exoglucanase conjuguée à l'or colloïdal se fixe spécifiquement sur les liaisons  $\beta$ -(1,4)-D glucanes des extrémités non réductrices de la cellulose (Berg 1988, Nicole and Benhamou 1991b). Cette sonde permet la localisation de ce polymère dans les racines d'Hévéa sains ou infectés.

- b. **Immunolocalisation d'une laccase de *R. lignosus*:** Des anticorps polyclonaux, réalisés contre la laccase L1 purifié de *R. lignosus*, ont été utilisés pour la mise en évidence des sites antigéniques de cette glyco-protéine dans le bois de bouleau infecté. Les conditions de marquage, fondées sur l'utilisation d'anticorps primaires partiellement purifiés et d'un anticorps secondaire conjugué à l'or colloïdal, permettent ainsi de localiser l'enzyme au cours de la biodégradation de cellules végétales lignifiées (Nicole *et al.* 1992).

- c. **Mise en évidence de la chitine des parois de *R. lignosus*:** Une lectine de blé (WGA) reconnaît spécifiquement les liaisons  $\beta$ -(1,4) glucosamine, monomère constitutif de la chitine. Le traitement de coupes par cette lectine, suivi de l'ovomucoïde-or, permet la visualisation de la chitine des parois fongiques selon une technique décrit par Nicole et Benhamou (1991b).

- d. **Contrôles de la spécificité des sondes moléculaires:** Afin de vérifier la spécificité des sondes utilisées dans le cadre de cette étude, plusieurs contrôles ont été mis en oeuvre parmi lesquels (Benhamou 1989, Berg 1988, Herman 1988): une pré-incubation des sondes avec

leur substrats respectifs avant leur utilisation dans le processus de marquage, le remplacement des sondes par une sonde différente ne présentant pas d'affinité pour la molécule recherchée, l'incubation des coupes dans l'or colloïdal seul.

## RESULTATS ET DISCUSSION

L'approche cytochimique de la dégradation de la cellulose a révélé que ce polymère est dégradée dans les tissus racinaires de l'Hévéa dès les premiers stades de la pénétration des hyphes dans la plante. Les parois des cellules de l'assise péridermique présentent des figures d'érosion particulièrement marquées aux sites de pénétration des hyphes. Dans le jeune liège, les parois se composent de deux couches distinctes, l'une subérifiée et l'autre cellulosique. Soumise à l'action du parasite, cette dernière montre sans ambiguïté une altération profonde associée à une modification ultrastructurale de sa texture. De telles perturbations pariétales interviennent également dans le phloème, bien que la présence des hyphes y ait rarement été observée (Nicole *et al.* 1982, Nicole *et al.* 1986b).

Les résultats les plus caractéristiques, résultant de l'étude cytochimique de la dégradation de la cellulose, ont été acquis après examen des tissus lignifiés endommagés. Le marquage à l'or révèle l'existence de zones totalement dépourvues de particules d'or expliquant (i) une dégradation partielle de la cellulose (destruction des extrémités non réductrices) ou (ii) une digestion complète de la cellulose laissant de ce fait apparaître d'autres composés pariétaux tels les hémicelluloses et/ou la lignine. Après analyse, il apparaît que la cellulose serait le premier polymère du bois à être dégradé par *R. lignosus*, facilitant ainsi l'accès à la lignine aux enzymes impliquées dans sa dégradation (i.e. laccases et Mn-peroxydase dépendante) (Geiger *et al.* 1986a, Geiger *et al.* 1986d). Les cellulases de *R. lignosus* (Geiger *et al.* 1986b, Geiger *et al.* 1986d, Nicole and Benhamou 1991a), très actives durant l'infection du système racinaire de l'Hévéa, se révéleraient donc être des enzymes essentielles à colonisation des tissus et la dégradation des parois ligno-cellulosiques.

Parmi les enzymes impliquées dans la dégradation du bois, les laccases jouent un rôle important dans les modifications de la lignine, comme rapporté par Geiger *et al.* (1986a) dans le cas d'une laccase de *R. lignosus*. Les techniques d'immuno-localisation, appliquées au bois infecté, ont précisé la distribution de cette enzyme durant les mécanismes de pourrissement (Nicole *et al.* 1992). Il apparaît ainsi que la laccase, cytoplasmique d'abord, est ensuite localisée dans l'espace périplasmique du champignon et dans sa paroi, avant d'être excrétée dans les cellules hôtes.

L'enzyme est localisée soit au contact, soit à une certaine distance du champignon. Elle semble cependant incapable de diffuser dans le bois apparemment sain, probablement en raison d'un environnement stérique défavorable à son transport, ou de l'inaccessibilité chimique de son substrat. Dans des parois en cours de dégradation, l'enzyme est distribuée dans tous les types pariétaux, indépendamment de leur constitution. En revanche, les parois montrant un stade avancé de pourrissement contiennent peu ou pas d'enzyme, suggérant l'absence, ou le masquage, de son substrat.

Enfin, il est fréquent de constater la localisation de molécules de laccase sur les microfibrilles des matrices fongiques extracellulaires. Cette observation soulève de fait la question du transport des enzymes extracellulaires du parasite vers leur substrat spécifique durant l'altération des composés parétaux de la plante.

Les modifications ultrastructurales du champignon au cours de la pathogénèse se traduisent non seulement par une désorganisation plus ou moins apparente du cytoplasme de certains hyphes mais aussi, et surtout, par une dégradation de leurs parois. Afin de mieux apprécier les perturbations que subit cette paroi durant la colonisation des tissus racinaires, une lectine de blé a été utilisée pour localiser spécifiquement la glucosamine acétylée, monomère constitutif de la chitine des parois des champignons.

Quelle que soit la nature des tissus infectés (cellulosique, subérifiée ou lignifiée), la pénétration des parois des cellules hôtes par les hyphes mycéliens induit une modification de la chitine fongique dans les portions de filaments localisées dans la paroi hôte. La chitine est soit dégradée soit modifiée, ou masquée, de telle manière à être inaccessible à la lectine. De tels changements dans la conformation de la paroi du champignon ne sont vraisemblablement pas étrangers à sa localisation intrapariétale où le parasite sécrète un grand nombre d'enzymes responsables de la dégradation des polymères végétaux.

Dans cette optique, *R. lignosus* disposerait d'un, ou plusieurs, mécanisme(s) lui permettant de moduler l'organisation de sa paroi en fonction de son environnement soit en modifiant la constitution de la chitine pariétale, soit en modifiant les proportions des composantes de sa paroi (chitine et glucanes). Par ailleurs, l'examen minutieux des coupes ultra-fines a révélé, dans le cytoplasme des cellules hôtes, de nombreuses particules d'or au voisinage des hyphes endommagés.

Ce marquage suggère fortement la présence d'oligomères de chitine dont l'origine est probablement attribuable à l'action hydrolytique d'endochitinases de l'Hévéa (Nicole and Benhamou 1991b, Nicole *et al.* 1992). Ces oligosaccharides, connus pour leur pouvoir éliciteur de certaines réactions de défense des plantes, induisent dans le système racinaire de l'Hévéa, des mécanismes de lignification réactionnelle ainsi que la stimulation du cambium subéro-phelloidermique et des dépôts de callose le long des parois du phloème (Nicole *et al.* 1991).

La démarche expérimentale rapportée dans cette article est fondée sur l'étude cytochimique ultrastructurale des pourritures racinaires de l'Hévéa causée par *R. lignosus*. Elle vérifie les hypothèses précédentes concernant la biodégradation des polymères des ligneux (Geiger *et al.* 1986a, Geiger *et al.* 1986b, Geiger *et al.* 1986d, Nicole *et al.* 1982, Nicole *et al.* 1986c, Nicole *et al.* 1987, Nicole *et al.* 1986b, Nicole *et al.* 1982) et précise, en outre, certains mécanismes de la pathogénèse de ces maladies (Geiger *et al.* 1989, Nicole *et al.* 1986a, Nicole *et al.* 1992, Nicole *et al.* 1991).

La cellulose est dégradée dès les premières étapes de la colonisation des tissus racinaires; dans le xylème, l'altération de ce polymère crée des voies d'accès à la lignine pour les oxydases du champignon. Parmi elles, la laccase s'avère présente au cours de la dégradation du bois, à l'exception des étapes initiale et ultime. Enfin, la paroi de *R. lignosus* subit deux

contraintes, l'une liée à l'excrétion active des enzymes impliquées dans le pourrissement des racines, l'autre liée à l'action des chitinases de l'arbre. Dans les deux cas, la chitine pariétale du parasite apparaît considérablement modifiée.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Bendayan M. (1984). Enzyme-gold electron microscopic cytochemistry: a new affinity approach for the ultrastructural localization of macromolecules. *Journal of Electron Microscope Techniques* 1: 349-372.
- Benhamou N. (1989). Preparation and applications of lectin-gold complexes. In: *Colloidal gold: principles, methods and applications*. Vol. 1. Ed. Hayat, Academic Press. pp. 95-143.
- Berg R.H. (1988). Enzyme-gold affinity labelling of cellulose. *Journal of Electron Microscope Techniques* 8: 371-379.
- Herman E.M. (1988). Immunocytochemical localization of macromolecules with the electron microscope. *Annual Review Plant Physiology and Molecular Biology* 39: 139-155.
- McFadden G.I. (1991). *In situ* hybridization techniques: molecular cytology goes ultrastructural. In: *Electron microscopy of plant cells*. Hall and Hawes, Eds. Academic Press. pp. 219-255.
- Geiger J.P., Huguenin B., Nicole M. and Nandris D. (1986a). Laccases of *Rigidoporus lignosus* and *Phellinus noxius*. II. Effects of *R. lignosus* laccase L1 on thioglycolic lignin of Hevea. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 13: 97-111.
- Geiger J.P., Nicole M., Nandris D. and Rio B. (1986b). Root rot diseases of *Hevea brasiliensis*. I. Physiological and biochemical aspects of root aggression. *European journal of Forest Pathology* 16: 22-36.
- Geiger J.P., Rio B., Nandris D. and Nicole M. (1986c). Laccases of *Rigidoporus lignosus* and *Phellinus noxius*. I. Purification and some physico-chemical properties. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 12: 121-134.
- Geiger J.P., Rio B., Nicole M., and Nandris D. (1986d). Biodegradation of *Hevea brasiliensis* wood by *Rigidoporus lignosus* and *Phellinus noxius*. *European Journal of Forest Pathology* 16: 147-159.
- Geiger J.P., Rio B., Nicole M. and Nandris D. (1989). Peroxidase production in tissues of the rubber tree following infection by root rot fungi. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 34: 241-256.
- Nandris D., Nicole M., et Geiger J.P. (1983). Infections artificielles de jeunes plants d'*Hevea brasiliensis* par *Rigidoporus lignosus* et *Phellinus noxius*. *European Journal of Forest Pathology* 13: 65-76.
- Nandris D., Nicole M., and Geiger J.P. (1987). Root rot diseases of rubber-tree. *Plant Disease* 71: 298-306.
- Nicole M. and Benhamou N. (1991a). Cytochemical aspects of cellulose breakdown during the infection process of rubber tree roots infected by *Rigidoporus lignosus*. *Phytopathology* 81: 1412-1420.
- Nicole M. and Benhamou N. (1991b). 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., Chamberland H., Geiger J.P., Lecours N., Valero J., Rio B. and Ouellette G.B. (1992). Immunocytochemical localization of laccase L1 in wood decayed by *Rigidoporus lignosus*. *Applied and Environmental Microbiology* 58.
- Nicole M., Geiger J.P. et Nandris D. (1982). Aspects ultrastructuraux de la dégradation du phloème d'*Hevea brasiliensis* par *Rigidoporus lignosus*. *Compte-rendus de l'Académie des Sciences*, Paris, Série III, 471-476.
- Nicole M., Geiger J.P. and Nandris D. (1986a). Root rot diseases of *Hevea brasiliensis*. II. Some host reactions. *European Journal of Forest Pathology* 16: 37-55.
- Nicole M., Geiger J.P. and Nandris D. (1986b). Ultrastructure of laticifer modifications in *Hevea brasiliensis* infected with root rot fungi. *Journal of Phytopathology* 116: 259-268.

- Nicole M., Geiger J.P. and Nandris D. (1986c). Penetration and degradation of suberized cells of *Hevea brasiliensis* infected with root rot fungi. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 28: 181-185.
- Nicole M., Geiger J.P. et Nandris D. (1987). Ultrastructural aspects of rubber tree root rot diseases. *European Journal of Forest Pathology* 17: 1-10.
- Nicole M., Nandris D. et Geiger J.P. (1982). Interactions hôte-parasites entre *Hevea brasiliensis* et les agents de la pourriture racinaire *Rigidoporus lignosus* et *Phellinus noxius*: étude physiopathologique comparée. *Phytopathologische Zeitschrift* 105: 311-326.
- Nicole M., Toppan A., Geiger J.P., Roby D., Rio B, and Nandris D. (1991). Defense responses of *Hevea brasiliensis* to elicitors from root rot fungi. *Canadian Journal of Botany* 69: 1819-1824.
- Nicole M., Geiger J.P. and Nandris D. (1992). Mechanisms of defense of angiosperm roots to fungal invasion. In: *Defense mechanisms of woody plants against fungi*. R.A. Blanchette and A.R. Biggs, Eds. Springer Verlag, New York, Heidelberg. pp. 181-206.

**INTERACTIONS PLANTES  
MICROORGANISMES**

**SENEGAL  
FEBRUARY 1992**

**ifs**

**Fondation Internationale pour la Science**

# **INTERACTIONS PLANTES MICROORGANISMES**

## ***INTERACTIONS BETWEEN PLANTS AND MICROORGANISMS***

**Compte rendu du séminaire régional organisé par  
la Fondation Internationale pour la Science (IFS)  
et l'Institut Français de Recherche Scientifique  
pour le Développement en Coopération (ORSTOM)**

**Dakar, Sénégal  
17-22 février 1992**

Organisateurs:

Fondation Internationale pour la Science (IFS)  
Institut Français de Recherche Scientifique  
pour le Développement en Coopération (ORSTOM)

Co-financé par:

Institut Français de Recherche Scientifique  
pour le Développement en Coopération (ORSTOM)  
Islamic Educational, Scientific and Cultural Organization (ISESCO)  
Centre Technique de Coopération Agricole et Rurale (CTA)

Publié par:

Fondation Internationale pour la Science (IFS)  
Grev Turegatan 19, 114 38 Stockholm, Sweden

Rédaction:

Judith N. Wolf

Les communications qui figurent dans cette publication ont été reproduites telles que soumises et n'ont pas été revues par des pairs, ni révisées du point de vue scientifique par la Fondation Internationale pour la Science (IFS). Les opinions exprimées n'engagent que les auteurs et pas la Fondation Internationale pour la Science (IFS).

La loi du 11 mars 1957 n'autorisant, aux termes des alinéas 2 et 3 de l'article 41, d'une part, que les "copies ou reproductions strictement réservées à l'usage privé du copiste et non destinées à une utilisation collective" et, d'autre part, que les analyses et les courtes citations dans un but d'exemple et d'illustration, "toute représentation ou reproduction intégrale, ou partielle, faite sans le consentement de l'auteur ou de ses ayants droits ou ayants cause, est illicite" (alinéa 1er de l'article 40). Cette représentation ou reproduction, par quelque procédé que ce soit, constituerait donc une contrefaçon sanctionnée par les articles 425 et suivants du Code Pénal.

ISBN: 91 85798 31 2