

COAGULATION *IN SITU* DU LATEX D'*HEVEA BRASILIENSIS* LORS D'UNE
ATTAQUE PARASITAIRE, PAR *RIGIDOPORUS LIGNOSUS*, OU D'UN STRESS
PHYSIOLOGIQUE : LA MALADIE DES ENCOCHES SECHES

Michel NICOLE^{*}, Hervé CRETIN[†] et Elisabeth de FAY,^{**}

RESUME : L'examen ultrastructural du latex d'*Hevea brasiliensis* attaqué par *R. lignosus*, ou atteint d'encoches sèches, montre que le latex est coagulé à l'intérieur des laticifères.

L'étude biochimique révèle que la coagulation *in situ* est étroitement liée à la déstabilisation des membranes des lutoïdes et des particules de Frey-Wyssling. L'éclatement de ces organites résulte de la peroxydation des lipides insaturés de leurs membranes.

ABSTRACT : Phloem ultrastructural observations of *R. lignosus* infected roots of *Hevea brasiliensis* or of "brown bast" disease in the same trees, show the latex coagulation inside laticif vessels. Biochemical studies reveal a destabilisation of the lutoïds and Frey-Wyssling particles membranes, resulting from of the peroxydation membrane insaturated lipids.

Rigidoporus lignosus est l'agent du pourridié blanc des racines d'*Hevea brasiliensis*. Des recherches précédentes ont montré que ce champignon cause d'importants dégâts aux tissus racinaires (1,2,). Connue pour son action drastique sur les structures ligneuses (3), *R. lignosus* provoque également, au cours du processus infectieux un arrêt partiel ou total de l'écoulement du latex au voisinage de la zone racinaire infectée.

Le blocage de la production du latex s'explique par sa coagulation à l'intérieur des laticifères. Chez l'Hévéa, ce phénomène a déjà été évoqué dans le cas du syndrome des encoches sèches dont il est l'une des caractéristiques (4).

L'étude de la coagulation du latex au niveau de l'encoche de saignée, (5,6,7,8), montre sans ambiguïté que les facteurs coagulants sont essentiellement compartimentés au sein des lutoïdes. Leurs éclatements libèrent ces facteurs et favorisent la prise en masse du caoutchouc.

Aucune donnée, cependant, ne permet d'affirmer, qu'*in situ*, après l'attaque de *R. lignosus*, la coagulation du latex s'effectue de la même manière que celle décrite au niveau de l'encoche. Aussi avons nous, dans un premier temps confirmé l'existence du phénomène de coagulation interne. A cet égard nous avons examiné au microscope électronique (*), des coupes effectuées au niveau du phloème de jeunes racines d'*Hevea* inoculées artificiellement par ce parasite (9), et préparées pour l'observation selon les méthodes classiques (17). Dans un second temps, la comparaison de ces données avec celles obtenues par ailleurs (4) sur les encoches sèches, a conduit, après une approche biochimique, à proposer un mécanisme de la coagulation du latex à l'intérieur des laticifères.

Rappelons que chez une plante saine, le latex est défini comme un cytoplasme de nature colloïdale constitué essentiellement (17) :

- de particules de caoutchouc (pl. 1 fig. 1)
- de lutoïdes : vacuoles à caractère lysosomal (8, 12)
- des particules à double membrane : les particules de Frey-Wyssling.

Ces particules sont en suspension dans le sérum cytoplasmique cellulaire (pl. 1 fig. 1)-. Chargées négativement, elles maintiennent, par leur répulsion électrostatique, la stabilité colloïdale du latex. Toute rupture de cette stabilité aboutit à la floculation puis à la coagulation du latex.

L'examen microscopique des vaisseaux laticifères en début d'infection, révèle une modification notable des particules de caoutchouc, (pl. 1 fig. 2). Celles ci, aux contours diffus, apparaissent en effet moins homogènes, certaines d'entre elles fusionnent pour former des agrégats de petite taille, régulièrement distribués dans la cellule. Par la suite, la matrice cytoplasmique prend un aspect granuleux et osmophile ; elle renferme de nombreux microcoagula (pl. 1 fig. 3), ainsi que des petites vacuoles, signe caractéristique de dégénérescence cellulaire. La phase de déstabilisation du latex est alors atteinte.

A un stade plus avancé, les microcoagula sont plus volumineux et plus compacts (pl. 1 fig. 4). Certaines structures membranaires demeurent cependant encore visibles, mais les inclusions granuleuses du cytoplasme ont quasiment disparu. Cet état caractérise la coagulation ; (pl. 1 fig. 5) (5). Au stade ultime, l'ensemble du contenu cytoplasmique des cellules laticifères se prend en masse, (pl. 1 fig. 6), alors que les éléments du cytoplasme des cellules parenchymateuses voisines, sont encore intacts. Tout le latex aggloméré occupe, de manière générale le centre des vaisseaux.

Ces étapes de la coagulation *in situ* ont également été observées à l'intérieur des laticifères d'Hévéa atteints d'encoche sèche (pl. 11 ; fig. 1 à 6). Cette coagulation est alors parfois associée à l'apparition de thyllosoïdes (4), structures jamais rencontrées lors d'une attaque par *R. lignosus*.

Compte tenu des analogies observées dans ces deux cas de stress les études biochimiques ont été réalisées essentiellement, pour des raisons de commodité, sur des latex récoltés au niveau de troncs d'Hévéa atteints d'encoche sèche, plutôt qu'au niveau de racines atteintes de pourridiés. Aussi avons-nous recherché certaines caractéristiques propres aux latex d'arbres atteints d'encoche sèche partielle, comparées à des latex d'arbres sains de même âge.

Ces études ont montré la libération dans le sérum cytoplasmique laticifère de nombreuses enzymes, normalement compartimentées dans différentes organites membranaires propres au latex (12).

Nous avons mesuré, en particulier, les activités phosphatasiques acides libres (10) et totales dont le rapport, appelé indice d'éclatement IE (8), rend compte de l'intégrité des lutoïdes.

Les résultats, rapportés dans le tableau I, montrent l'augmentation très forte de l'IE des lutoïdes chez les arbres atteints d'encoche sèche. Le même phénomène a pu être détecté au niveau de latex provenant de zones en cours d'infection par *R. lignosus*.

L'analyse des activités ortho-diphénoloxydases (13), normalement compartimentées dans les particules de Frey-Wyssling sédimentables (13,14), met en évidence leur apparition dans le sérum cytoplasmique d'arbres stressés (Tableau I). Une vérification par électrophorèse sur gel d'amidon (13) montre que ces enzymes, retrouvées dans le cytoplasme, sont effectivement originaires des particules de Frey-Wyssling. Leurs activités sont toutefois largement sous évaluées compte tenu du pouvoir inhibiteur (70 à 90 %) du sérum cytoplasmique (13). Ainsi, la diminution des activités sédimentables corrélative à l'augmentation des activités cytoplasmiques, traduit la lyse des particules de Frey-Wyssling dans les latex d'arbres en état de stress.

Ces résultats, montrent que les latex provenant d'arbres traumatisés, se caractérisent par une instabilité extrême des organites membranaires qu'ils renferment. Cette instabilité conduit à leur éclatement et à la libération de leur contenu coagulant, à l'intérieur des laticifères.

Notons que cet éclatement des structures membranaires natives n'exclue toutefois pas la possibilité de re-vésiculation des membranes pour former les microvacuoles mises en évidence dans les latex déstabilisés (pl. 1. fig. 3).

La coagulation localisée au niveau de l'extrémité des laticifères, sectionnée lors de la saignée, s'explique par l'éclatement des particules sous l'action conjuguée de plusieurs phénomènes mécaniques et physico-chimiques, due à la blessure des tissus de l'écorce (7).

Ces mêmes phénomènes n'expliquent cependant pas la coagulation "à distance", à l'intérieur même des laticifères non directement lésés (encoches sèches, pourriture racinaire...).

Nous avons alors recherché s'il existait, dans ces derniers, un mécanisme biochimique susceptible de déstabiliser les membranes biologiques *in situ*, et en particulier la membrane lutoïdique.

C'est ainsi que nous avons mis en évidence, dans le sédiment lutoïdique (30.000 g) du latex provenant d'arbres atteints d'encoche sèche, une "activité NAD (P) H oxydase" génératrice de formes éminemment toxiques de l'oxygène. Cette activité enzymatique, localisée au niveau des lutoïdes, se traduit par une absorption d'oxygène NAD (P) H dépendante. L'addition de superoxyde dismutase (SOD) (15,16) et de catalase exogène inhibe presque totalement l'absorption d'oxygène, ce qui confirme l'émission de radicaux superoxydes et d'eau oxygénée par le système.

Par ailleurs, cette activité est insensible aux inhibiteurs classiques des chaînes respiratoires, éliminant de ce fait toute possibilités de contaminations microbiennes ou mitochondriales.

Enfin, l'adjonction, *in vitro*, de NADH (0,5 mM) à une suspension de lutoïdes purifiés provenant d'arbres atteints d'encoche sèche, se traduit par une intense consommation d'oxygène corrélative à la disparition du NADH exogène, et par une très forte augmentation de l'indice d'éclatement des lutoïdes. Le même type d'expérience réalisé en présence d'acides gras insaturés exogènes tel l'acide linoléique, constituant important de la membrane lutoïdique (18), aboutit à la libération de malondialdéhyde, (16), sous-produit de la dégradation peroxydative de cet acide gras (fig. 1). Ces activités restent à peine décelables chez les latex d'arbres sains.

Tous ces phénomènes sont également inhibés, au moins partiellement, par l'addition de superoxyde dismutase et de catalase exogène.

Ainsi, le mécanisme de coagulation du latex à l'intérieur des laticifères d'*Hevea brasiliensis*, en réponse à une agression d'origine externe (parasitaire ou traumatique...), s'explique chronologiquement par :

- le démasquage d'activités enzymatiques génératrices d'oxygène toxique ;
- la dégradation peroxydative des lipides membranaires insaturés
- la déstabilisation de certaines membranes biologiques.

L'une des conséquences en est la décompartmentation des facteurs coagulants présents, sous forme latente, dans les organites du latex.

Il apparaît donc que le principe de coagulation du latex *in situ*, est identique à celui décrit au niveau de l'encoche (éclatement des lutoïdes..). Le mécanisme est par contre différent : dans le cas d'agressions externes soutenues, il est d'ordre biochimique, alors que dans le cas de la saignée il est conditionné par des phénomènes purement physiques et très localisés au niveau de la blessure.

En conclusion, les résultats acquis proposent un mécanisme de la coagulation interne du latex d'*Hevea brasiliensis* en réponse à une agression externe.

Les travaux menés actuellement doivent confirmer ces données nouvelles. Deux orientations ont de ce fait été retenues :

- L'étude ultrastructurale de la cinétique "d'éclatement" des particules membranaires du latex au cours d'une agression externe.
- L'étude biochimique approfondie de la déstabilisation des membranes particulières du latex.

(N.B) : L'étude microscopique a été réalisée au groupe d'étude et de recherche en microscopie électronique (GERME) du ministère de la recherche scientifique de Côte d'Ivoire. Nous remercions ainsi Mr N'DIAYE Alassane d'avoir mis à notre disposition l'équipement nécessaire à la réalisation de nos expériences.

Les graines d'Hévéa et le latex ont été récolté sur la plantation expérimentale de l'IRCA (Institut de Recherche du Caoutchouc en Afrique) Côte d'Ivoire.

- (1) J.P. GEIGER, *Physiol. Vég.*, 13 (2), 1975, 307-330
- (2) J.P. GEIGER, D. NANDRIS et M. GOUJON, *Physiol. Vég.*, 14 (2) 1976, 271-282.
- (3) J.P. GEIGER et B. HUGUENIN, 1981, abs., cong. Int. cult. trop. Lyon, France.
- (4) E. de FAY et C. HEBANT, *Comptes rendus*, 291, Serie D, 1980, 865-868.
- (5) P. HANOWER, J. BRZOWSKA et C. LIORET, *Physiol. Vég.*, 14 (4), 1976, 677-693.
- (6) J. BRZOWSKA-HANOWER, H. CRETIN, P. HANOWER et P. MICHEL, *Physiol. Vég.*, 17 (4), 1979, 851-867.
- (7) W.A. SOUTHORN, *J. Rub. Res. Inst. mal.*, 21 (4), 1968, 494-512.
- (8) D. RIBAILLIER, Thèse doct. d'Etat., Abidjan, 1972.
- (9) D. NANDRIS et M. NICOLE, 1981, abs., Cong. Int. Prot. Cult. Trop. Lyon, France.
- (10) K. LINDHART et K. WALTER, in *Methods of enzymatic analysis*, Bergmeyer H.K. Acad. Press. N.Y., 1963.
- (11) R. WATTIAUX et C. de DUVE, *Biochem. J.*, 63 ; 1956 ; 606-608.
- (12) S. PUJARNISCLE, Thèse doct. d'Etat. Paris, 1969.
- (13) J. BRZOWSKA-HANOWER, P. HANOWER, et C. LIORET, *Physiol. Vég.*, 18 (2), 1978, 231-254.
- (14) M. COUPE, S. PUJARNISCLE et J. d'AUZAC, *Physiol. Vég.*, 10, 1972 459-480.
- (15) I. FRIDOVICH, *Adv-Enz.*, 41, 1974, 45-97.
- (16) K.L. FONG, P.B. McCAY, et J.C. POYER, *J. Biol. Chem*, 248 (22) 1973, 7792-7797.

- (17) P.B. DICKENSON, J. Rubs. Inst. Mal., 21 (4), 1969, 543-559.
(18) J. DUPONT, F. MOREAU, C. LANCE et J.L. JACOB, Phytochem., 15, 1976, 1215-1217.

- Adresses -

- ✕ M.N. et H. C. : Laboratoire de phytopathologie et laboratoire de Physiologie Végétale. ORSTOM. B.P. V-51 Abidjan R.C.I.
✕✕ E.F. : Laboratoire de Biologie végétale. Faculté des Sciences ? Université d'Abidjan B.P. 43.22 R.C.I.

EXPLICATION DES PLANCHES

PLANCHE I

Toutes les figures (1 à 6) montrent des coupes fines colorées à l'acétate d'uranyle et au citrate de plomb. Cc : particule de caoutchouc ; cp : cellule parenchymateuse libérienne ; g : appareil de Golgi. L : Lutoïde ; lc : latex coagulé ; 1 m : lamelle moyenne ; mc : microcoagulum ; pl : paroi des cellules laticifères ; v : vacuole.

- Fig. 1.- Vaisseau laticifère d'une jeune racine non infectée ; on y remarque : de nombreuses particules de caoutchouc ainsi que des lutoïdes dont un plus "jeune" renferment des protéines fibrillaires (G x 72000).
- Fig. 2.- Premier symptôme de coagulation du latex : fusion des particules de caoutchouc (flèches : G x 12000).
- Fig. 3.- Phase de destabilisation du latex : le cytoplasme dense et granuleux contient de nombreux microcoagula ainsi que de nombreuses petites vacuoles (flèches : G x 15000).
- Fig. 4.- Stade de coagulation du latex : présence d'aggrégats de caoutchouc épais et compacts, au sein du cytoplasme ; disparition progressive des inclusions granuleuses. (G x 12000)
- Fig. 5.- Phase précédant la prise en masse du caoutchouc ; les structures membranaires ont complètement disparu (G x 12000)
- Fig. 6.- Phase ultime de la dégradation des laticifères : le latex est pris en masse. Le cytoplasme périplasmique de la cellule parenchymateuse contigue apparaît cependant encore intact. (G x 12000).

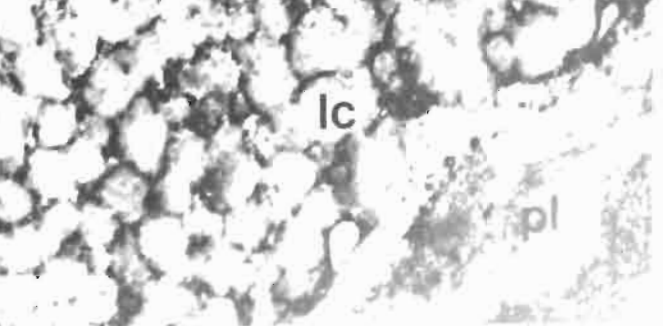
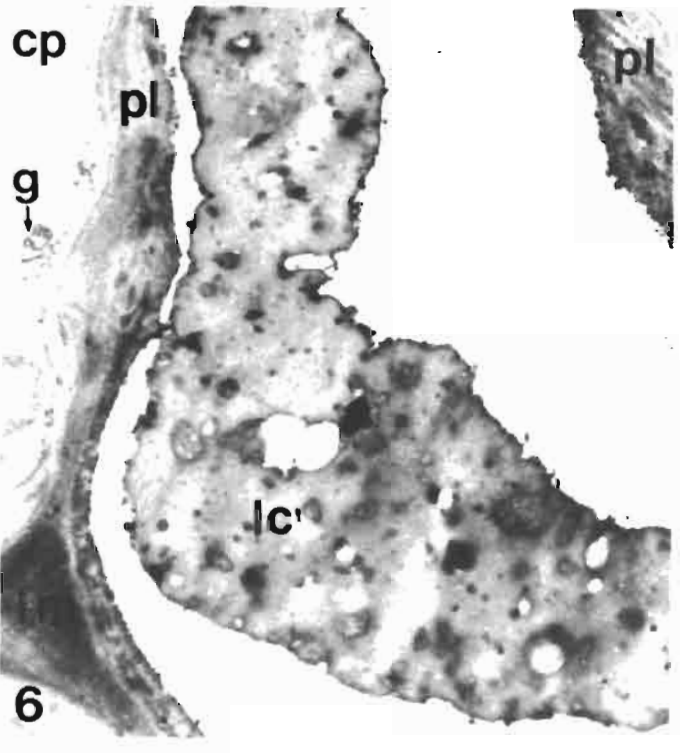
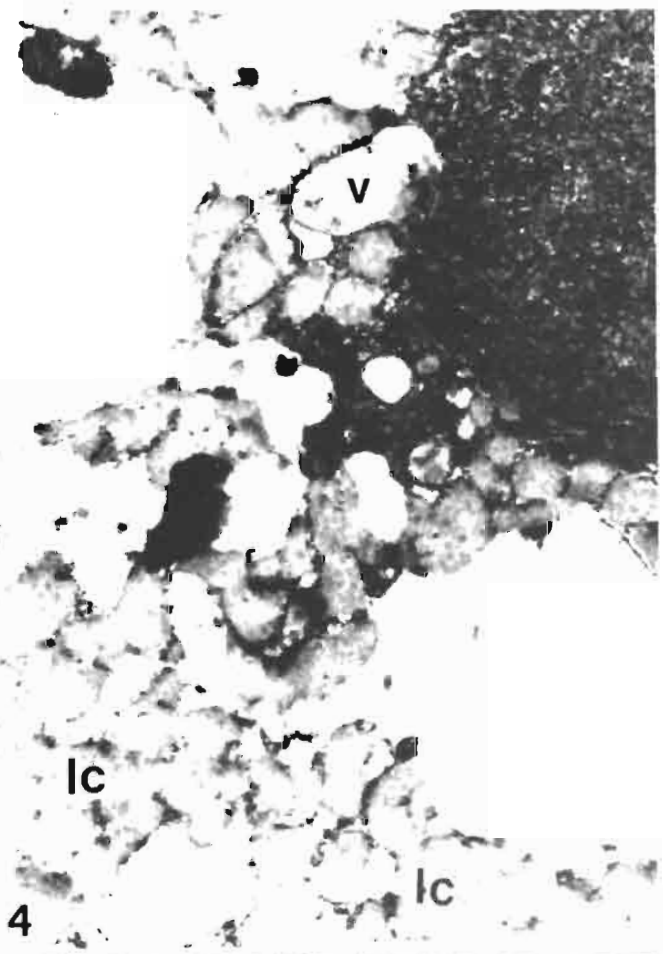
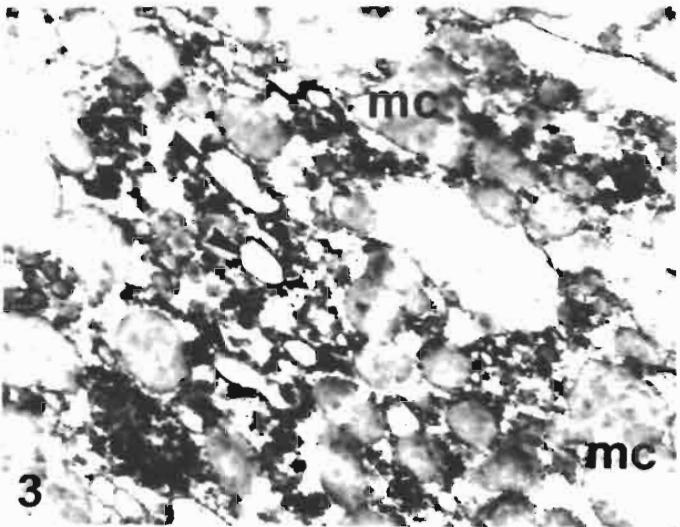
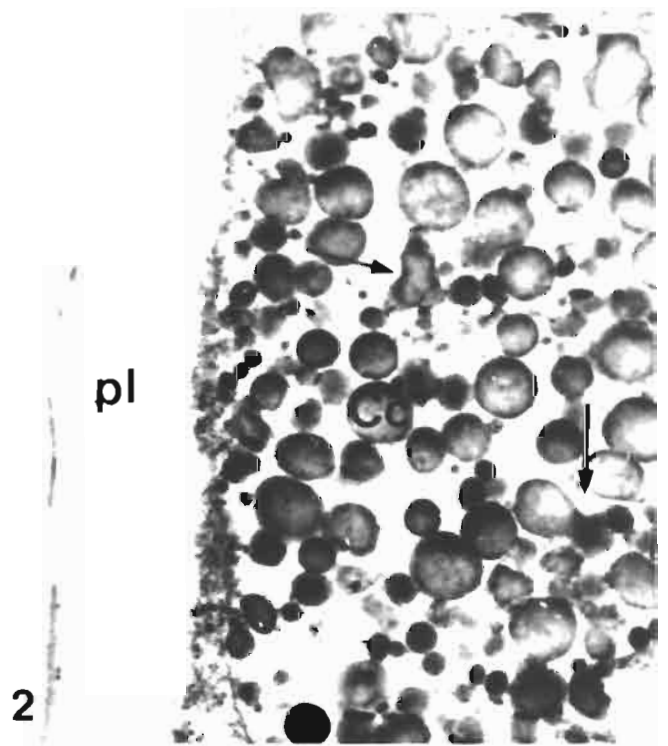
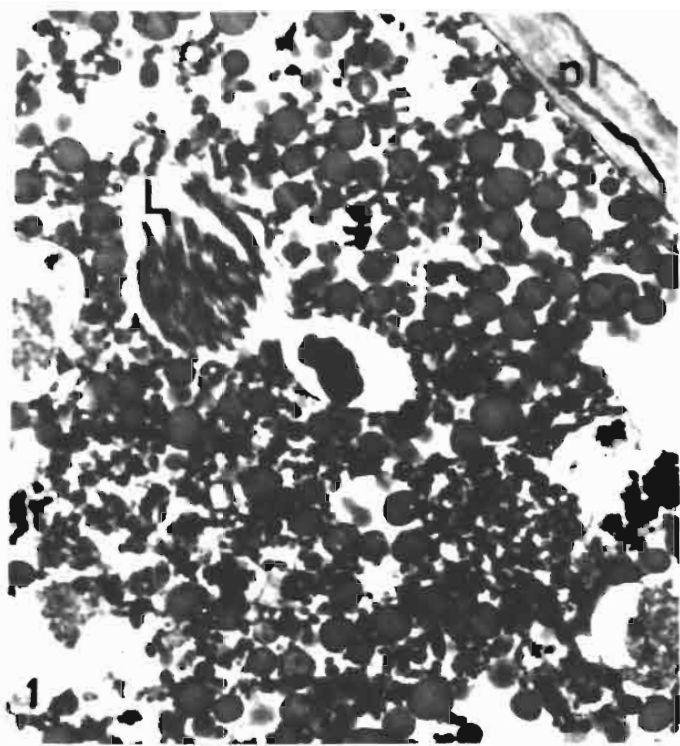
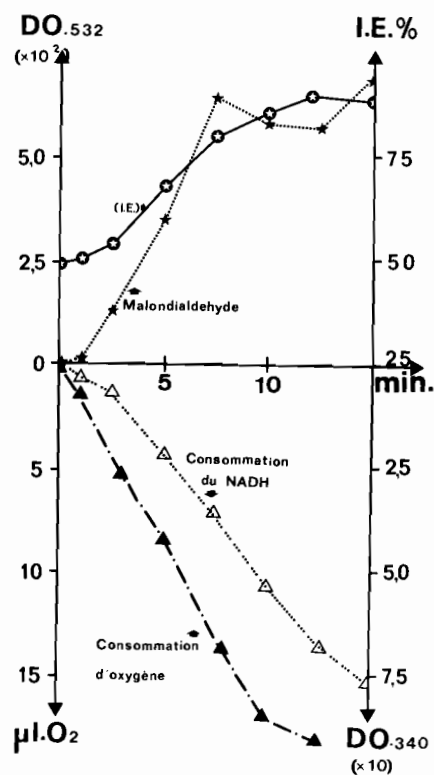


Figure I : Cinétique de la consommation de l'oxygène ($\mu\text{l O}_2$: $-\blacktriangle-$) et du NADH exogène (DO-340 nm : $\dots\triangle\dots$) par des lutoïdes provenant d'Hévéa atteints d'encoches sèches, en suspension dans un tampon isotonique à pH 7,4 . Apparition simultanée de malondialdéhyde (DO-532 nm : $\dots\star\dots$), sous produit de la peroxydation de l'acide linoléique exogène, et évolution concomitante de l'indice d'éclatement des lutoïdes (IE % : $-\star-$)



ARBRES	IE %	o-DPOX Sed. DO/O,1 ml/min.	o-DPOX Cyt. DO/O,1 ml/min.
SAINS	21	1,63	0,00
ENCOCHE SECHE 30 %	38	0,63	0,054
ENCOCHE SECHE 70 %	56	0,49	0,168

TABLEAU I : Indice d'éclatement (IE) des lutoïdes et libération des activités ortho-diphénol-oxyuases des particules de FREY-WYSSLING sédimentables (Sed.) dans le cytoplasme du latex (Cyt.) ; moyenne de 10 essais effectués sur un mélange de latex, soit de 10 arbres sains soit de 13 arbres atteints d'encoche sèche à 30 %, ou 19 atteints à 70 %.

Nicole Michel, Chrestin Hervé, Fay E.

Coagulation in situ du latex d'*Hevea brasiliensis* lors d'une attaque parasitaire, par *Rigidoporus lignosus* ou d'un stress physiologique : la maladie des encoches sèches

Adiopodoumé : ORSTOM, 1981, 12 p. multigr.