

CYTOLOGIE VÉGÉTALE. — *Etude comparative des exoenzymes libérées par les deux types mycéliens constitutifs du thalle du Corticium rolfsii (Sacc.) Curzi.*

Note (*) de M. Jean-Paul Geiger, présentée par M. Roger Heim.

Le comportement parasitaire de chacun des types mycéliens constitutifs du thalle du *Corticium rolfsii* s'explique non seulement par des aptitudes physiologiques particulières, mais également par des capacités de synthèse et d'excrétion enzymatique différentes.

Au cours du développement du *C. rolfsii* se succèdent deux formes mycéliennes caractérisées par des morphologies et des physiologies différentes [(¹), (²)]. Que ce soit en culture ou sur les hôtes du parasite, la première (forme latérale) est adaptée à l'exploration profonde du substrat, alors que la seconde (forme conductrice) assure son exploration superficielle. Il apparaît donc que les hyphes latérales sont les seules qui, pénétrant les tissus de l'hôte, sont susceptibles de l'endommager. Les hyphes conductrices, en effet, sont non seulement incapables de végéter au sein de ces tissus mais peuvent même progresser à leur surface sans provoquer la moindre lésion (³).

Nous avons tenté, en comparant l'activité de certaines exoenzymes libérées par les deux types mycéliens, d'expliquer cette différence de comportement. Au cours de cette étude nous nous sommes particulièrement attachés à la recherche des hydrolases en raison du rôle essentiel joué par ces enzymes dans la dégradation des constituants cellulaires. Cependant, certains auteurs comme Bateman (⁴) insistant sur l'importance de l'acide oxalique dans le processus parasitaire, nous avons également éprouvé la glyoxylate déshydrogénase qui gouverne la synthèse de cet acide.

L'analyse des produits d'excrétion des hyphes latérales et des hyphes conductrices n'était possible que dans la mesure où ces deux formes mycéliennes pouvaient être cultivées séparément. Nous sommes parvenus en réalisant, en milieu liquide agité, des cultures constamment submergées, à obtenir, quatre jours après le semis, des thalles faits uniquement d'hyphes latérales. Par ailleurs, en déposant au centre d'une boîte de Pétri dont le fond était, au préalable, couvert d'une mince pellicule d'eau, une coupelle contenant une culture de *C. rolfsii* sur milieu gélosé, nous avons pu provoquer la formation de mèches conductrices qui en cinq jours envahissent le couvercle de la boîte et dont les contaminants de type latéral sont négligeables. Ces procédés placent le mycélium dans des conditions différentes de celles qui sont réalisées dans la nature. Cependant l'anaérobiose partielle qui résulte de la culture immergée diffère peu de celle qui règne au sein des tissus végétaux et la surface des couvercles de la boîte de Pétri peut, dans une certaine mesure, être comparée à la cuticule d'une plante hôte, celle-ci n'étant pas pénétrée par les hyphes conductrices.

Les exoenzymes sont caractérisées et leur activité est mesurée, d'une part, dans les filtrats de culture et dans les eaux de lavage du mycélium, en ce qui concerne les hyphes latérales, d'autre part, dans les eaux de lavage du mycélium et du couvercle de la boîte de Pétri en ce qui concerne les filaments conducteurs. Les essais sont

O. R. S. T. O. M.

Collection de Référence

n°

5799 Phyto

GEIGER

5 DEC. 1972

effectués après centrifugation et concentration par dialyse contre du polyéthylène-glycol (PEG 6000) de ces différentes liqueurs. Dans tous les cas, le milieu nutritif utilisé est un bouillon de haricot (¹⁰) et les lavages sont effectués à l'aide d'une solution tamponnée citrate-acide citrique 0,01 M, pH 4,6, additionnée de mannitol pour atteindre une concentration finale de 0,2 M. Avant les tests, les filtrats de culture sont ajustés à la même molarité que cette solution pour les diverses substances qu'elle contient. Enfin, le mycélium est broyé, dans la même solution tamponnée ; le broyat est centrifugé et l'activité des enzymes caractérisées dans les filtrats et les eaux de lavage est mesurée dans le surnageant afin d'évaluer le taux d'excrétion de chacune d'entre elles.

Les techniques utilisées sont respectivement celle de Pujarnisclé (⁵), à pH = 5, pour la phosphatase (EC 3.1.3.2), la phosphodiesterase (EC 3.1.4.1), la N-acétylglucosaminidase (EC 3.2.1.30), la glucosidase (EC 3.2.1.21) et la galactosidase (EC 3.2.1.23) ; celle de Schucher (⁶) à pH = 5 pour la ribonucléase (RNase) ; celle de Tsung Che Tseng (⁷) à pH = 4,6 pour les phosphatidases. L'activité des pectinases et des cellulases est mesurée à l'aide d'un viscosimètre d'Ostwald sur un tampon citrate-acide citrique 0,025 M pH = 4,6, additionné de polypectate de sodium à 1 % pour les premières et de CM cellulose à 0,4 % pour les secondes. Dans les deux cas le volume final est de 8,5 ml. Enfin, la glyoxylate déshydrogénase est éprouvée à pH = 9, par la méthode de Maxwell (⁸) et la quantité d'acide oxalique synthétisé est dosée par manganimétrie.

Les activités spécifiques intra et extracellulaires de ces diverses enzymes sont rapportées au contenu protéique des extraits mycéliens évalué par la méthode de Lowry (⁹).

Le tableau permet d'apprécier les différences importantes existant dans la capacité de synthèse d'enzymes hydrolytiques par les deux types mycéliens. Il montre qu'à l'exception de la glucosidase, ces enzymes sont excrétées à un taux 10 à 30 fois plus élevé (près de 200 fois pour la cellulase) par les hyphes latérales que par les filaments conducteurs. Par ailleurs les filaments latéraux sont seuls capables de synthétiser la glyoxylate déshydrogénase autorisant ainsi l'accumulation d'acide oxalique. Ce dernier résultat est confirmé par les dosages de l'oxalate dans les filtrats de cultures des hyphes latérales (80 mg/mg de protéines mycéliennes) et les eaux de lavage des filaments conducteurs (0 mg).

Outre les enzymes extracellulaires classiquement décrites dans la littérature (cellulases, pectinases, phosphatidases), nous avons mis en évidence une phosphodiesterase, une ribonucléase et une N-acétylglucosaminidase, enzymes qui, à ce jour, n'ont jamais été citées comme étant excrétées par le *C. rolfsii*.

Par ailleurs il apparaît que chez le *C. rolfsii* ces différentes hydrolases sont synthétisées essentiellement par le mycélium de type latéral lequel semble de ce fait capable de dégrader la plupart des structures cellulaires de l'hôte. La cellulase et la pectinase s'attaquent respectivement aux parois cellulosesiques et aux lamelles moyennes. Les phosphatidases sont responsables de l'hydrolyse des phospholipides libres et probablement de la partie phospholipidique des lipoprotéines de la membrane cytoplasmique. Elles doivent donc entraîner sinon une dislocation du système

TABLEAU

Enzymes	Mycélium conducteur (C)			Mycélium latéral (L)			E (*)
	Activités spécifiques			Activités spécifiques			L/C (***)
	I (*)	E (*)	E/I (**)	I (*)	E (*)	E/I (**)	
Phosphatase (a)	434	445	1	815	4 160	5	9,3
Phosphodiesterase (a)	0,95	2,6	2,7	3,7	16,5	4,4	6,3
glucosidase (a)	177	290	1,6	47	260	5,5	0,9
galactosidase (a)	4,2	17,6	4,2	6,95	200	29	11
N - acétylglucosaminidase (a)	18	9,4	0,5	4,7	306	65	32
Ribonucléase (b)	1,2	4,8	4	0,95	113	119	23
Cellulase (c)	—	70	—	—	13 220	—	188
Pectinase (c)	—	148	—	—	1 121	—	8
Phosphatidases (d)	ε (d 1)	ε (d 2)	—	ε (d 3)	44 (d 4)	—	—
Glyoxylate - déshydrogénase (a)	0	0	—	130	0	—	—

(*) I et E représentent respectivement l'activité intracellulaire et l'activité extracellulaire.

(**) E/I : rapport de l'activité extracellulaire sur l'activité intracellulaire (permet d'apprécier la capacité d'excrétion d'un type mycélien donné pour l'enzyme considérée).

(***) L/C : rapport de l'activité des enzymes excrétées par les filaments latéraux sur l'activité des enzymes homologues excrétées par les conducteurs.

(a) Activité spécifique en μM de substrat transformé/mn/mg de protéines (mycéliennes).

(b) Activité exprimée en D. O. $\times 100/\text{mn/mg}$ de protéines.

(c) Activité exprimée en « Activité relative » $\times 10/\text{mg}$ de protéines.

(d) Surface (en mm^2) de lécithine hydrolysée en 24 h par 0,2 ml d'extrait mycélien ou de filtrat (ou eaux de lavage) concentré (d 1, d 2, d 3, d 4 correspondent respectivement à l'activité due, dans ce cas précis, à 78, 28, 70 et 16 μg de protéines).

membranaire, du moins des modifications considérables de la perméabilité cellulaire. La N-acétylglucosaminidase est susceptible, encore que l'hypothèse reste à vérifier, de constituer un maillon d'un système enzymatique complexe dégradant diverses molécules glycoprotéiques. Le rôle de la ribonucléase, enfin, est plus délicat à définir. Il est certain que son action sur les ARN des cellules de l'hôte doit restreindre, sinon annuler, la capacité de synthèse protéique de celles-ci, leur ôtant toute possibilité de réaction défensive liée à une néosynthèse des protéines. Par ailleurs elle peut permettre au parasite d'utiliser, pour l'élaboration de ses propres acides nucléiques, les nucléotides libérés sous son action conjuguée à celle de la phosphodiesterase.

L'efficacité de l'arsenal enzymatique produit par les filaments latéraux se trouve encore accrue par le fait que ce type mycélien excrète des quantités appréciables d'acide oxalique. L'effet favorable de cet acide sur l'activité des polygalacturonases a été mis en évidence par Bateman (4) qui l'attribue à sa capacité de complexer les ions calcium, inhibiteurs de ces enzymes. Nous pensons que l'acide oxalique accroît, également, l'activité des autres hydrolases dans la mesure où il provoque

une acidification des tissus de l'hôte car l'activité optimale de la plupart de ces enzymes est obtenue lorsque le pH est compris entre 3 et 4.

Il ressort de ce qui précède que les deux types mycéliens que nous avons comparés diffèrent, aussi bien qualitativement que quantitativement, en matière de synthèse enzymatique et que le comportement parasitaire qui les caractérise se justifie à la fois par des aptitudes physiologiques particulières ⁽¹⁾ et par une disproportion des armes chimiques dont ils disposent. Les filaments conducteurs, incapables de se développer en anaérobiose, même partielle, excrètent peu d'hydrolases et n'ont aucune possibilité de détruire des tissus au sein desquels ils ne pourraient progresser. Ils détachent des hyphes latérales susceptibles de végéter dans les profondeurs du substrat et qui seules peuvent exploiter les cellules végétales en raison, d'une part, de leur capacité exceptionnelle de synthèse et d'excrétion d'enzymes hydrolytiques extrêmement actives et, d'autre part, de la possibilité dont elles disposent de libérer dans le milieu une substance qui favorise l'activité de ces enzymes : l'acide oxalique.

(*) Séance du 2 octobre 1972.

- (1) M. GOUJON, *Comptes rendus*, 263, Série D, 1966, p. 1965.
- (2) M. GOUJON, *Comptes rendus*, 264, Série D, 1967, p. 261.
- (3) M. GOUJON, *Cah. ORSTOM*, série Biol., 7, 1969, p. 69.
- (4) D. F. BATEMAN et S. V. BEER, *Phytopathology*, 55, 1965, p. 204.
- (5) S. PUJARNISCLE, *Mémoire ORSTOM*, 48, 1971.
- (6) R. SCHUCHER et L. E. HOKIN, *J. Biol. Chem.*, 210, 1954, p. 551.
- (7) T. C. TSENG et D. F. BATEMAN, *Phytopathology*, 58, 1968, p. 1437.
- (8) D. P. MAXWELL et D. F. BATEMAN, *Phytopathology*, 58, 1968, p. 1635.
- (9) O. H. LOWRY, N. J. ROSEBROUGH, R. J. FARR et R. J. RANDALL, *J. Biol. Chem.*, 193, 1951, p. 265.
- (10) Il s'agit d'un bouillon de haricot préparé en autoclavant, durant 20 mn, 400 g de haricots frais dans un litre d'eau. Le bouillon est filtré sur coton, réajusté à un litre, réparti suivant les besoins et stérilisé.

*Laboratoire de Phytopathologie du Centre ORSTOM d'Adiopodoumé,
B. P. n° 20, Abidjan, Côte-d'Ivoire ;
Laboratoire de Morphologie Expérimentale Végétale,
associé au CNRS,
Faculté des Sciences, 91405 Orsay, Essonne.*