

**Activité des laccases et des peroxydases
au sein de racines d'Hévéa
attaquées par le pourridié blanc
(*Leptoporus lignosus* (Kl.) Heim)**

J.-P. GEIGER, D. NANDRIS et M. GOUJON

*Laboratoire de Phytopathologie de l'O.R.S.T.O.M.,
Centre d'Adiopodoumé, B.P. n° 20, Abidjan, Côte-d'Ivoire
Laboratoire de Morphologie expérimentale végétale associé au C.N.R.S.,
Faculté des Sciences, 91405 Orsay*

(Manuscrit reçu le 9 décembre 1975)

RÉSUMÉ

L'examen de pivots d'Hévéa partiellement colonisés par le *Leptoporus lignosus* révèle la présence de la laccase dans les seuls tissus infectés. L'activité peroxydasique est importante dans les tissus sains; elle passe par un maximum soit au niveau du front de progression du parasite, soit à quelques centimètres en avant de celui-ci.

L'étude chromatographique montre l'existence, dans les tissus parasités, de deux laccases respectivement identiques à deux isoenzymes excrétées par le Champignon en culture pure. De ces mêmes tissus parasités on peut extraire plusieurs peroxydases dont le comportement chromatographique est identique à celui des peroxy-

I. — INTRODUCTION

Parmi les Champignons parasites d'espèces arbustives, les pourridiés blancs et particulièrement le *Leptoporus lignosus* (Kl.) Heim ex Pat. se signalent par l'importance des dégâts qu'ils causent aux plantations d'Hévéas. Conduits par des nécessités de rentabilité à court terme, la plupart des travaux entrepris ont eu pour but la mise au point de méthodes prophylactiques (MARTIN et DU PLESSIX, 1965, NEWSAM, 1964; FOX, 1966; TAYSUM, 1966; FASSI, 1968), laissant dans l'ombre les aspects biologiques du processus parasitaire. Le plus souvent les techniques de lutte, tant chimiques que mécaniques, s'avèrent imparfaites. En effet, si elles permettent de retarder la progression de la maladie, elles sont en revanche incapables d'éliminer les foyers d'infection. L'élaboration de méthodes de lutte plus efficaces nécessite une connaissance approfondie de l'agent pathogène et de la physiologie du parasitisme. Aussi des études ont-elles été entreprises dans ce sens : morpho-

2. Révélation des enzymes

a. Milieux réactionnels

La laccase (paradiphénoloxydase N° : 1. 10. 3. 2) est révélée par son activité sur le gaïacol en solution à 0,2 % dans un tampon phosphate 0,05 M, pH 6.

La peroxydase (N° : 1. 11. 1) est testée dans un milieu ayant la composition suivante : gaïacol à 0,2 % et eau oxygénée à 0,1 % dans un tampon phosphate 0,05 M pH 6. Dans les deux cas les réactions sont effectuées dans un volume final égal à 5 ml.

b. Révélation in situ

Suivant l'enzyme recherchée, l'un ou l'autre milieu réactionnel est répandu au brumisateuseur sur la surface de coupe fraîchement dégauchie d'un demi-pivot. Une coloration caractéristique, rouge violacé, se développe alors au niveau des tissus possédant une laccase ou une peroxydase (suivant la nature du milieu réactionnel utilisé).

c. Recherche de l'activité enzymatique d'échantillons de bois

A l'aide d'un emporte-pièce de 18 mm de diamètre, on prélève des échantillons de tissus sur toute la surface de coupe du pivot. Chaque rondelle, d'une épaisseur de 3 à 4 mm est séparée en deux parties égales, l'une étant utilisée pour révéler la laccase, l'autre la peroxydase. A cet effet l'échantillon est plongé dans 5 ml de milieu réactionnel constamment agité. L'activité enzymatique est exprimée en $DO \times 1\ 000/\text{min}/\text{échantillon}$.

L'impossibilité de répéter une mesure sur le même échantillon, une certaine imprécision dans le calibrage de l'épaisseur des rondelles due à des différences notables des qualités mécaniques du bois sain et parasité introduisent une incertitude dans les mesures dont il faut tenir compte. Aussi n'attribuons-nous à ce test qu'une valeur semi-quantitative. Cette technique permet néanmoins de déceler rapidement la présence ou l'absence d'une enzyme dans les tissus analysés.

d. Extraction des enzymes

Des copeaux de bois sont broyés par petites quantités (broyeur Gondard), afin d'obtenir une sciure plus ou moins fine suivant la nature du tissu. Ce broyat est mis à macérer dans deux fois son poids de tampon Tris-HCl 0,025 M pH 8,4 durant 12 heures à 4°C, puis est trituré dans un mortier en présence de sable. L'extrait séparé des fragments de bois par filtration sur verre fritté est centrifugé à froid durant 10 mn à 30 000 $\times g$.

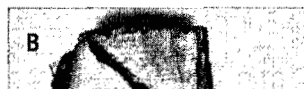
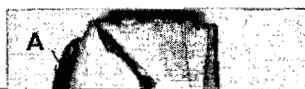
e. Chromatographie sur DEAE-cellulose

L'extrait est déposé au sommet d'une colonne de DEAE-cellulose ($\varnothing = 2\text{ cm}$, $h = 12\text{ cm}$) préalablement équilibrée dans du tampon Tris-HCl 0,025 M pH 8,4, puis la colonne est lavée à l'aide de 50 ml de cette même solution. La totalité de l'effluent est recueillie. Les protéines sont éluées par un gradient de concentration linéaire en KCl : $2 \times 250\text{ ml}$ [Tris-HCl 0,025 M pH 8,4, KCl 0,0 M] [Tris-HCl 0,025 M pH 8,4, KCl 0,3 M.] La vitesse d'éluion est égale à 30 ml/h; l'éluat est recueilli par fractions de 5 ml. Les fractions successives sont utilisées alternativement pour la recherche de la laccase et pour celle de la peroxydase. Les réactions enzymatiques sont effectuées dans des milieux identiques à ceux décrits plus haut. Les activités sont exprimées en $DO_{420} \times 100/\text{ml}/\text{min}$.

III. — RÉSULTATS ET DISCUSSION

A. Observation d'un pivot partiellement parasité

L'examen de nombreux pivots parasités permet de dégager un aspect général du processus de l'envahissement du bois par le *L. lignosus*. Ainsi on peut toujours distinguer, de la base du collet à la partie profonde du pivot, deux zones caractéristiques (fig. 1 A; 2 A, 3 A) : la première, de couleur claire, correspond aux tissus



direction du collet et dont la pointe se situe au niveau du cylindre central. Les branches du V sont le plus souvent d'importance égale; il convient cependant de noter qu'au niveau des brèches racinaires la progression du parasite est entravée ce qui peut entraîner une dissymétrie (fig. 2 A). De récentes études sur le mode de progres-

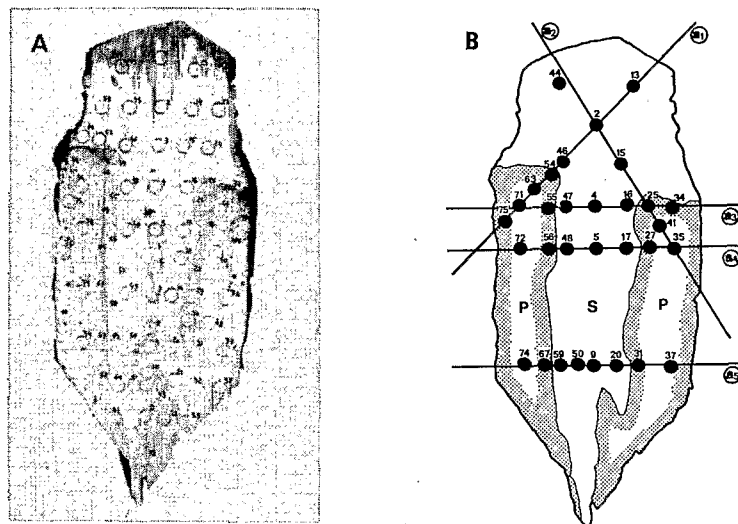


FIG. 3. — Répartition de la laccase et de la peroxydase.

A, lieu de prélèvement des échantillons; B, disposition et numérotation des échantillons prélevés sur cinq axes différents (résultats des analyses : fig. 4).

sion du *L. lignosus* nous ont permis d'établir que cette forme en V résulte de la facilité relative du Champignon à se développer dans les tissus corticaux et superficiels

(résultats non publiés). On observe que l'intensité de la coloration ocre, maximale au niveau du front, décroît progressivement vers l'arrière du pivot. On constate parallèlement une perte graduelle de la cohérence tissulaire.

B. Répartition de la laccase et de la peroxydase

Dans un premier temps nous avons tenté de repérer, globalement, les tissus

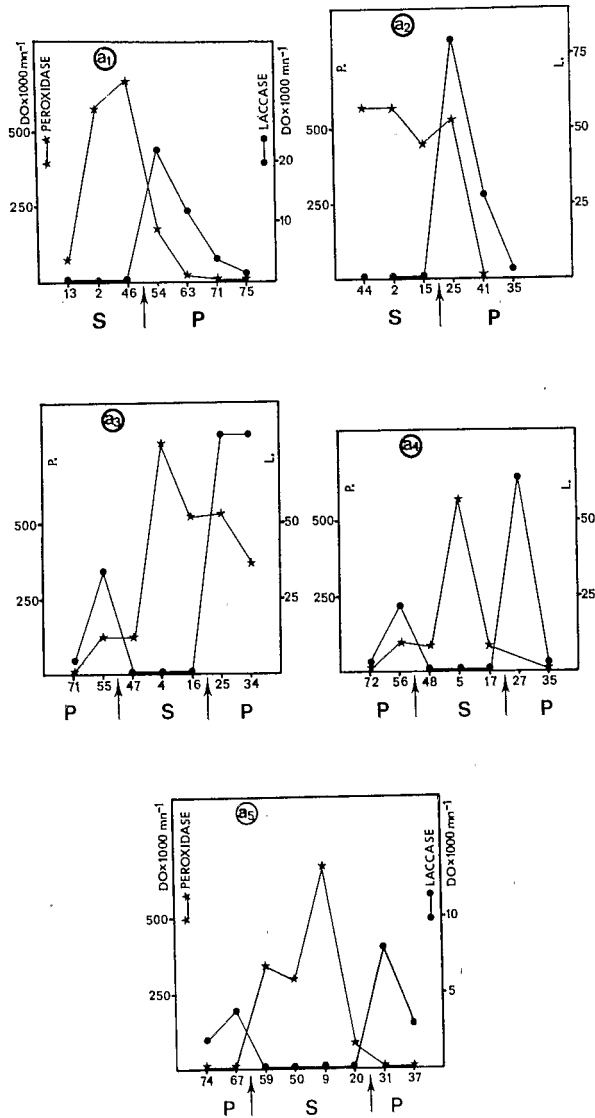


FIG. 4. — Répartition de la laccase et de la peroxydase suivant les axes (a₁), (a₂), (a₃), (a₄) et (a₅) représentés schématiquement sur la figure 3 B.

qui permet une approche semi-quantitative des phénomènes. Les échantillons sont prélevés sur la surface de coupe du pivot suivant des lignes coupant à la fois les tissus sains et infectés (fig. 2 A, 3 A et B).

1. Laccase

La laccase n'a jamais pu être détectée dans les tissus sains, même après une longue incubation des échantillons. Dans tous les pivots étudiés la présence de cette enzyme est strictement limitée à la zone de tissus colonisés par le champignon.

Sa répartition au sein de ceux-ci n'est cependant pas uniforme. L'activité enzymatique est toujours maximale au niveau du front de progression du parasite. Elle diminue graduellement à mesure qu'augmente la distance entre le front et le lieu de prélèvement de l'échantillon. Très généralement les tissus infectés situés à plus de 5-10 cm du front ne présentent plus qu'une très faible activité laccase, bien que le *L. lignosus* puisse toujours en être isolé.

2. Peroxydase

L'activité de la peroxydase est élevée dans toute la partie saine du pivot. Des variations sont cependant observées à proximité du front de progression. Le plus souvent l'activité passe par un maximum à 2 ou 3 cm en avant des tissus parasités, puis diminue brutalement aux abords immédiats de ceux-ci. Bien que le parasite ne soit pas encore présent, il est vraisemblable que les substances excrétées par le champignon perturbent à distance l'équilibre métabolique et interviennent en particulier sur la biosynthèse de la peroxydase au niveau des tissus avoisinant le front de progression. Ce type de répartition souffre certaines exceptions; parfois la chute d'activité de la peroxydase ne s'observe pas. Ainsi dans la partie supérieure des branches du « V » elle se maintient souvent à un niveau élevé (*fig. 4*, axes a_2 et a_3 , échantillons n^{os} 25 et 34). L'augmentation de l'activité de la peroxydase au niveau du front d'attaque ou en avant de celui-ci ne constitue pas un phénomène exceptionnel. Comme de nombreux chercheurs l'ont signalé, elle est la règle lorsque les végétaux subissent une agression d'origine virale ou fongique (FARKAS et STAHMANN, 1966; FEHRMANN et DIMOND, 1967; *inter alia*...).

C. Origine de la laccase et de la peroxydase des tissus parasités

Les résultats que nous venons de présenter permettent de supposer que la laccase des tissus parasités est synthétisée par le *L. lignosus* et non par l'hôte, alors que la peroxydase est exclusivement produite par ce dernier. Nous avons tenté

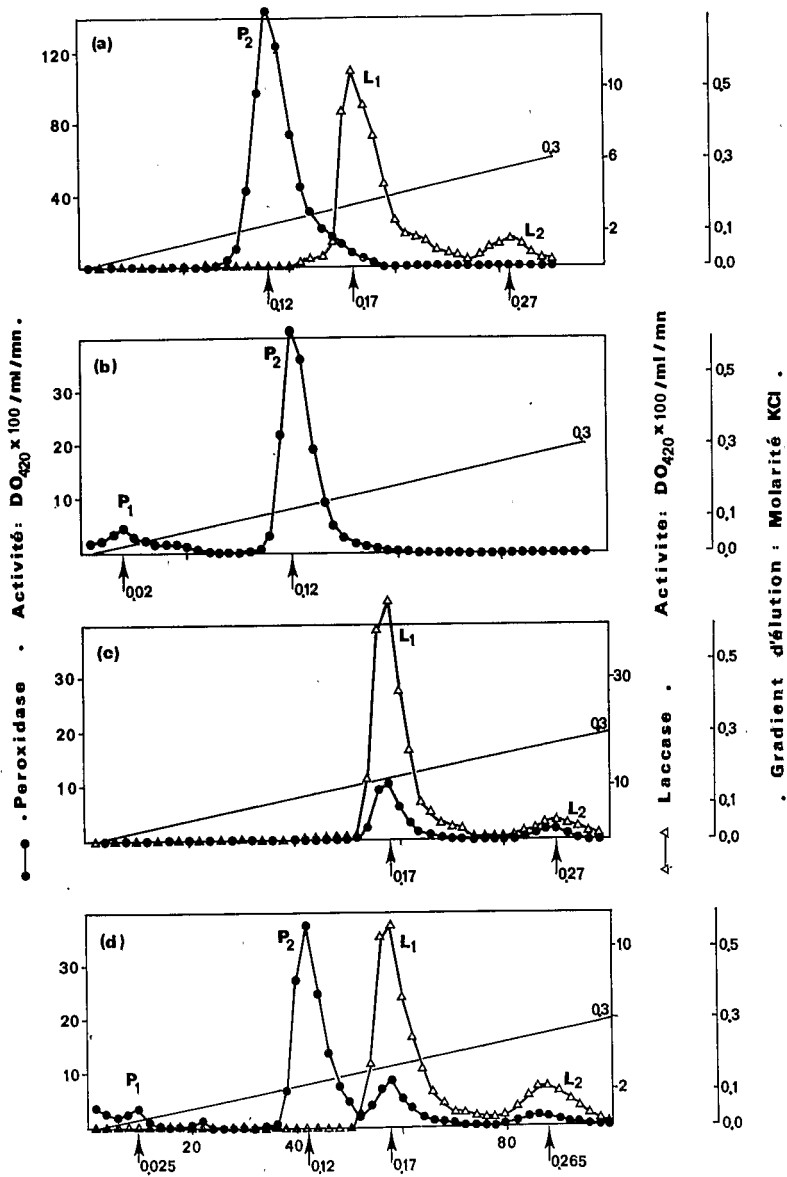


FIG. 5. — Chromatographie sur DEAE-cellulose.

Diagramme d'élu­tion des laccases (L_1 et L_2) et des peroxydases (P_1 et P_2) d'origine différente :
 (a) extrait de tissus parasités; (b) extrait de tissus sains; (c) filtrat de culture; (d) mélange :
 extrait de tissus sains + filtrat de culture.

En abscisse : numéro des fractions. Le nombre inscrit sous la flèche indique la molarité d'élu­tion (en KCl) de l'enzyme considéré.

Ces observations sont à rapprocher de celles effectuées par MOSBACH (1963) et KIRK *et al.* (1968 *a* et *b*) sur les laccases de *Polyporus versicolor*. Ce parasite, appartenant lui aussi au groupe des pourridiés blancs, excrète deux laccases, l'une faiblement, l'autre fortement retenue sur DEAE-cellulose. Encore s'agirait-il plutôt, d'après MAYAUDON et SARKAR (1975) de deux groupes d'enzymes. Ces chercheurs isolent en effet, par filtration sur gel de Séphadex G 100, trois fractions qui, chacune, se subdivise, par chromatographie sur DEAE-cellulose, en quatre sous-fractions *a*, *b*, *c* et *d*. Les sous-fractions (*a*) sont faiblement adsorbées sur l'échangeur anionique tandis que les autres le sont bien plus fortement. Considérant les fractions isolées sur G 100, MAYAUDON et SARKAR estiment que la laccase II de poids moléculaire intermédiaire, pourrait dériver de la laccase I sous l'effet d'une protéolyse partielle.

Dans l'état actuel de nos expériences sur les laccases de *L. lignosus*, trois hypothèses peuvent être également envisagées : les deux enzymes seraient codées par deux gènes différents ou bien l'une dériverait de l'autre soit par suite d'un réarrangement éventuel de différentes sous-unités, soit par suite d'une protéolyse ménagée ; l'extrait de tissus parasités, notamment, présente une activité protéolytique modeste mais non négligeable (environ 0,1 DO/ml/h à pH 8,5; test par la méthode à l'Azocoll).

Pour chacune des deux laccases définies (L_1 ou L_2) et ce quelle que soit leur origine (extrait de bois infecté ou filtrat de culture de champignon), les comportements d'élution sur DEAE-cellulose ou de migration en électrophorèse sont les mêmes. L'absence d'activité laccase dans les tissus sains et cette identité de comportement, nous permettra de penser que ces deux enzymes sont exclusivement synthétisées par le parasite.

2. Peroxydase

Les tissus sains contiennent plusieurs isoperoxydases séparables en trois fractions (fig. 5 *b*) : une fraction P_{Eff} non retenue sur la colonne que l'on recueille dans l'effluent (d'où son nom), une enzyme P_1 éluée à 0,02 M en KCl et une peroxydase P_2 éluée par du KCl 0,12 molaire.

L'extrait de tissus de bois parasité (fig. 5 *a*) contient la fraction P_{Eff} ainsi que l'enzyme P_2 mais est dépourvu de l'enzyme P_1 .

Les peroxydases P_2 des tissus sains et parasités sont homogènes et se comportent de façon identique lorsqu'elles sont soumises à une migration électrophorétique. Il faut noter que les trois peroxydases (P_{Eff} , P_1 et P_2) ne sont pas les seules enzymes de ce type présentes dans les extraits de tissus. Ceux-ci comportent d'autres isoenzymes qui ne sont décelables sur l'électrophorégramme qu'après une révélation de très longue durée (12 à 24 heures). Leur activité ne représente qu'une très faible fraction de l'activité peroxydasique totale des extraits. C'est pourquoi ces peroxydases ne peuvent être caractérisées après chromatographie sur DEAE-cellulose.

L'analyse des filtrats de culture (fig. 5 *c*) révèle qu'aucune de ces trois peroxydases n'est excrétée, *in vitro*, par le *L. lignosus*. Il convient de rappeler que l'activité « pseudo-peroxydasique » enregistrée au niveau des pics L_1 et L_2 (fig. 5 *c* et *d*) résulte de l'action des laccases sur le substrat « peroxydase » (GEIGER, 1975). Ces deux pics n'apparaissent pas lors de l'analyse de l'extrait de tissus parasités en raison de la différence d'échelle utilisée pour représenter les deux types d'enzyme, l'activité globale des peroxydases étant généralement, dans ces extraits, 10 à 30 fois supérieure à celle des laccases.

Enfin, une évaluation quantitative de l'activité peroxydasique mesurée dans les différentes fractions (tableau I) révèle l'intervention, au niveau des tissus parasités, d'un mécanisme de régulation ayant pour effet de privilégier la biosynthèse de la peroxydase P_2 aux dépens de celle des autres isoenzymes (résultats non publiés).

TABLEAU I

Pourcentage d'activité laccasique et peroxydasique récupérée dans les différentes fractions, après chromatographie, par rapport à l'activité totale de l'extrait brut déposé sur la colonne (fig. 5)

Origine de l'extrait	Peroxydase			Laccases	
	P_{Eff}	P_1	P_2	L_1	L_2
T. parasités (Fig. 5 (a))	1	—	66	53	7
T. sains (Fig. 5 (b))	67	1,6	7,6	0	0
Filtrat (Fig. 5 (c))	0	0	0	73	6
Filtrat + T. sains (Fig. 5 (d))	52	0,7	5,2	43	12

L'ensemble des informations résultant de l'analyse par chromatographie sur colonne permet de supposer que les laccases des tissus parasités sont synthétisées par le champignon, tandis que les peroxydases le sont uniquement par l'hôte. A cet égard l'expérience de fractionnement des enzymes d'un mélange d'extrait de tissus sains et de filtrat de culture (fig. 5 d) paraît démonstratif, le diagramme d'éluion obtenu étant identique à celui résultant de la séparation des protéines de l'extrait de tissus parasités (à l'exception du pic P_1).

Cependant, pour vraisemblables qu'elles soient, ces conclusions ne sauraient, pour deux raisons principales, présenter un caractère de certitude absolu. D'une part, seule la comparaison de leur structure primaire permet d'affirmer sans équivoque que deux protéines sont identiques ou non. D'autre part rien ne permet d'exclure, *a priori*, que le génome de l'Hévéa comporte deux gènes codant deux laccases identiques à celles qui sont excrétées par le *L. lignosus*, la synthèse de ces enzymes n'étant induite qu'au moment de l'infection.

IV. — CONCLUSION

Cette étude nous a permis de préciser la répartition et l'origine des laccases et des peroxydases décelables dans les tissus racinaires de l'Hévéa envahis par le *L. lignosus*. Elle montre que la présence des laccases est strictement liée à celle du

parasite, les tissus sains en sont totalement dépourvus et que les deux isoenzymes extractibles des tissus parasités présentent un comportement chromatographique et électrophorétique identique à celui des deux laccases excrétées, *in vitro*, par le Champignon. Aussi peut-on estimer que ces deux enzymes, présentes dans les organes infectés, sont synthétisées par l'agent pathogène, alors que les peroxydases le sont exclusivement par l'hôte.

Il apparaît donc que la mise en évidence de la laccase permet de préciser la situation occupée par le *L. lignosus* dans les tissus racinaires. La simplicité de la méthode, à laquelle nous avons donné le nom de « test laccase », et la rapidité de son exécution lui confèrent un avantage certain sur les méthodes de cytologie. En principe elle ne permet pas de détecter spécifiquement le *L. lignosus* (elle ne dispense pas d'une identification du parasite par les techniques classiques de mycologie), mais plus généralement, l'ensemble des agents de pourritures blanches qui tous présentent la caractéristique d'excréter une ou plusieurs laccases.

REMERCIEMENTS

Nous remercions M. le Directeur de l'I.R.C.A. qui nous a autorisé à prélever le matériel végétal sur la plantation de l'Institut.

BIBLIOGRAPHIE

- BOISSON C., 1973. — De la basidiospore au rhizomorphe, déterminisme de l'agrégation chez le Basidiomycète *Leptoporus lignosus* (Kl.) Heim ex Pat. *Thèse Doc. d'État*, Université Paris-Sud, Centre d'Orsay.
- FASSI B., 1968. — Biologie du *Fomes lignosus* (Kl.) Bres. (*Leptoporus lignosus* (Kl.) Pat. ex Heim) et méthodes de lutte préventive dans les cultures arborescentes tropicales. *Bull. Séanc. Acad. r. Sci. Outre Mer.*, 3, 632-641.
- FARKAS G. L. et STAHMANN M. A., 1966. — On the nature of changes in Peroxydase isoenzymes in Bean Leaves infected by Southern Bean Mosaic Virus. *Phytopathology*, 56, 669-677.
- FEHRMANN H. et DIMOND A. E., 1967. — Peroxidase activity and *Phytophthora* resistance in different organs of the Potato plant. *Phytopathology*, 57, 69-72.
- FOX R. A., 1966. — White root disease of *Hevea brasiliensis* : collar protectant dressings. *J. Rubb. Res. Inst. Malaya*, 19, 231-241.
- GEIGER J.-P., 1975. — Aspects physiologiques et biochimiques de la spécialisation parasitaire. Cas particulier des *Corticium rolfsii* (Sacc.) Curzi et *Leptoporus lignosus* (Kl.) Heim ex Pat. Étude *in vitro*. *Physiol. vég.*, 13, 307-330.
- KIRK T. K. et KELMAN A., 1965. — Lignin degradation as related to the phenoloxidases of selected wood-decaying Basidiomycetes. *Phytopathology*, 55, 739-745.
- KIRK T. K., HARKIN J. M. et COWLING E. B., 1968 a. — Oxidation of gaiacyl — and veratrylglycerol - beta - gaiacyl ether by *Polyporus versicolor* and *Stereum frustulatum*. *Biochim. Biophys. Acta.*, 165, 134-144.

- MAYAUDON J. et SARKAR J.-M., 1975. — Laccases de *Polyporus versicolor* dans le sol et la litière. *Soil Biol. Biochem.*, **7**, 31-34.
- MOSBACH R., 1963. — Purification and some properties of laccase from *Polyporus versicolor*. *Biochim. Biophys. Acta*, **73**, 204-212.
- NEWSAM A., 1964. — In : Report of the Rubber Research Institute of Malaya. 118 p. Résumé in : *R.A.M.*, 1965, **44**, p. 225, n° 1221.
- PERIES O. S. et IRUGALBANDARA Z. E., 1973. Histology of Hevea roots infected by *Fomes lignosus*. *Ann. appl. Biol.*, **73**, 1-7.
- PICHEL R. J., 1956. — Les pourridiés de l'hévéa dans la cuvette congolaise. *Publ. I.N.E.A.C.*, série techn. **49**.
- SIMONS T. J. et ROSS A. F., 1970. — Enhanced peroxidase activity associated with induction of resistance to tobacco mosaic virus in hypersensitive tobacco. *Phytopathology*, **60**, 383-384.
- SMITHIES O., 1955. — Zone electrophoresis in starch gels : Group variations in the serum proteins of normal human adults. *Biochem. J.*, **61**, 629-641.
- TAYSUM D. H., 1966. — Pathological Division. *Rep. Rubb. Res. Inst. Malaya*, 1965, 55-65.