

MYCOLOGIE. — *Étude comparative des enzymes excrétées par les différents types mycéliens constitutifs du thalle du Leptoporus lignosus (Kl.) Heim.* Note (*) de **Jean-Paul Geiger** et **Maurice Goujon**, présentée par M. Roger Gautheret.

Les différents éléments du thalle du *Leptoporus lignosus* présentent en ce qui concerne la production d'enzymes extra-cellulaires, une spécialisation analogue à celle que nous avons constatée lors de l'étude du *Corticium rolfsii*. Comme chez ce dernier, l'excrétion enzymatique est l'apanage des hyphes immergées, mais la nature des enzymes libérées est différente, ce qui rend compte du comportement parasitaire particulier du *L. lignosus*.

According to the synthesis of extracellular enzymes, the different elements of the thallus of Leptoporus lignosus show a specialization similar to those of Corticium rolfsii. In both fungi the intramatricial mycelium is the only one which produces extracellular enzymes; but Leptoporus lignosus excretes laccases when Corticium rolfsii excretes hydrolases, which explains peculiar pathogenicity.

In vitro le développement du *Leptoporus lignosus* s'effectue en deux phases successives caractérisées, chacune, par la croissance d'un type d'hyphe particulier [(¹), (²)]. La première forme mycélienne (type A), peut végéter en anoxie partielle et progresser au sein des substrats qu'elle exploite. En revanche le second type de filament (type B) présente un développement uniquement aérien. Ce dernier a une vitesse de croissance élevée, le rendant apte à coloniser rapidement une partie importante du milieu nutritif ou de l'hôte et est susceptible de donner naissance à des structures agrégées.

Ainsi l'édification du thalle du *L. lignosus* fait intervenir une succession d'événements comparable à celle qui préside à la mise en place des éléments du thalle d'un autre Basidiomycète : le *Corticium rolfsii* [(³), (⁴)]. Ces deux champignons diffèrent totalement par leur comportement parasitaire puisque, contrairement au *C. rolfsii*, le *L. lignosus*, pourridié blanc, n'agresse que des organes lignifiés. Nous savons par ailleurs (⁵) que chez le *C. rolfsii* les hyphes latérales (homologues des filaments de type A) sont seules responsables de l'excrétion des enzymes extra-cellulaires.

Nous avons tenté de vérifier si les différences de nature des enzymes excrétées rendent compte du comportement parasitaire particulier de chacun des organismes et si les diverses formes mycéliennes du thalle du *L. lignosus* présentent une spécialisation analogue à celle des types mycéliens du *C. rolfsii*. Dans ce but nous avons mesuré la nature et l'activité des enzymes libérés par les trois types mycéliens du *L. lignosus*. Cette analyse était possible dans la mesure où les différentes formes mycéliennes pouvaient être cultivées séparément. Or, en milieu liquide agité, des cultures constamment immergées produisent en 7 jours, des thalles constitués uniquement d'hyphes de type A. Par ailleurs après 6 jours de culture sur sable imprégné de milieu nutritif recouvert d'une feuille de cellophane supportant le semis, le thalle est essentiellement constitué de filaments de type B. Enfin les structures agrégées naissent en 10 jours, en boîte de Roux contenant du sable humidifié par de l'eau etensemencé par une bûchette d'Hévée infectée (⁶).

Les enzymes extra-cellulaires sont caractérisées et leurs activités appréciées dans les filtrats de culture et les eaux de lavage du mycélium. Ce lavage est effectué à l'aide d'une solution tamponnée citrate-acide citrique 0,01 M pH 4,6 additionnée de mannitol 0,2 M en concentration finale. Les filtrats de culture sont ajustés à la même molarité que cette solution pour les diverses substances qu'elle contient. Eaux de lavage et filtrats de culture

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

Collection de Références

26 AOÛT 1977
8634 P2 A

CR

correspondants sont mélangés et homogénéisés puis concentrés par dialyse contre du « polyéthylèneglycol 6000 ». Le dialysat est recueilli, son volume mesuré et le taux de concentration calculé.

Enfin les différents types mycéliens (à l'exception des structures agrégées, non récupérables) sont broyés dans une solution tamponnée de même composition que la précédente. L'activité des enzymes intracellulaires homologues de celles caractérisées dans les filtrats de culture est mesurée dans le surnageant obtenu après centrifugation du broyat. De cette façon il est possible d'évaluer, pour chaque forme mycélienne, le taux d'excrétion de chacune des enzymes éprouvées.

TABLEAU

Enzymes	Mycélium agrégé (⁴)	Mycélium de type B			Mycélium de type A			E (¹)	
	—	—			—			—	
	E (¹)	I (¹)	E (¹)	E/I (²)	I (¹)	E (¹)	E/I (²)	A/B (³)	
Phosphatase (⁵).....	8	269	27	0,1	21	ε	—	—	
Phosphodiesterase (⁵).....	0	0,9	0	0	ε	0	—	—	
Ribonucléase (⁶).....	0,4	ε	4,1	—	0,12	0	0	—	
β-glucosidase (⁵).....	7,6	28	7,8	0,3	16	17	1	2	
β-galactosidase (⁵).....	1	1,8	0	0	0,7	0	0	—	
β-N-acétylglucosaminidase (⁵).....	1,4	7,2	3,7	0,5	7,4	17	2	4	
Cellulase (⁵).....	ε	—	ε	—	—	ε	—	—	
Pectinase (⁵).....	0	—	0	—	—	0	—	—	
Phénoloxydase {	DOPA (⁴)..	8	59	39	0,6	10	697	70	17
	Caïacol (⁴)..	9	6,3	33	5,2	34	2 820	83	85

(¹) I et E représentent respectivement l'activité intracellulaire et l'activité extra-cellulaire.

(²) E/I : rapport de l'activité extra-cellulaire sur l'activité intracellulaire.

(³) A/B : rapport de l'activité des enzymes excrétées par les hyphes de type A sur l'activité des enzymes homologues libérées par les filaments de type B.

(⁴) L'activité des enzymes libérées par le mycélium agrégé est exprimée en unités par culture.

(⁵) Activité exprimée en nanomoles de substrat transformé par minute par milligramme de protéines (mycéliennes).

(⁶) Activité en D.O. (260 nm) 100/mn/mg de protéines.

(⁷) « Activité relative » par milligramme de protéines (A.R. = 1 000/t₅₀; t₅₀ : temps, en minutes, nécessaire pour que la viscosité du substrat diminue de 50 %).

(⁸) Activité en D.O. (420 nm) × 1 000/mn/mg de protéines.

L'activité des phosphatases (E.C. 3.1.3.2), phosphodiesterase (E.C. 3.1.4.1), β-glucosidase (E.C. 3.2.1.21), β-galactosidase (E.C. 3.2.1.23), β-acétylglucosaminidase (E.C. 3.2.1.30), ribonucléase (RNase), pectinase et cellulase est mesurée suivant des techniques précédemment décrites (⁵). Les phénoloxydases sont éprouvées à pH 6 suivant la méthode de Lance (⁷) en utilisant deux substrats différents : le gaïacol et la dihydroxyphénylamine (DOPA).

Les activités enzymatiques intra et extra-cellulaires sont rapportées au contenu protéique des extraits mycéliens évalué selon la technique de Lowry et coll. (⁸). Dans le cas particulier des enzymes libérées par les structures agrégées, l'activité est exprimée en nombre d'unités enzymatiques par culture.

Le tableau résume l'ensemble de nos résultats.

On constate qu'aucun des types mycéliens n'excrète activement d'enzyme hydrolytique. Ce fait apparaît clairement si l'on effectue, pour chaque enzyme, le rapport de l'activité extra et intracellulaire correspondante. Ce rapport est, à deux exceptions près, très inférieur à l'unité. Il semble même inadéquat de parler d'« excrétion enzymatique ». L'activité « extra-cellulaire » pourrait en effet être mise sur le compte d'enzymes d'origine intracellulaire libérées au cours d'une faible lyse mycélienne. Il est donc vraisemblable que de telles enzymes, n'interviennent pas dans les processus parasitaires dont est responsable le *L. lignosus*. Le comportement de ce parasite diffère donc de celui du *C. rolfsii* qui, nous l'avons vu (*) libère une série d'hydrolases très actives.

Cette différence de comportement se manifeste également en ce qui concerne les phénoloxydases que le *L. lignosus*, contrairement au *C. rolfsii*, excrète en quantités importantes. Nous avons vérifié la spécificité enzymatique en faisant agir un filtrat de culture sur les composés phénoliques suivants : tyrosine, *p*-crésol, alpha-naphtol dihydroxyphénylalanine (DOPA), catéchol, hydroquinone, 1.3-naphtalène-diol, gaiacol et pyrogallol. A l'exception de la tyrosine et du *p*-crésol, tous ces phénols sont oxydés, par le filtrat de culture. Des expériences de purification d'enzymes par chromatographie sur colonne de DEAE-cellulose nous ont permis de séparer deux phénoloxydases de même spécificité enzymatique. Par ailleurs, une pré-incubation du filtrat de culture en présence de catalase purifiée n'a pas modifié la cinétique de la réaction. Enfin, l'addition, dans le milieu réactionnel, d'eau oxygénée à 0,1 % en concentration finale n'a pas augmenté la vitesse d'oxydation, mais au contraire a inhibé partiellement l'activité enzymatique. Ces informations nous permettent de conclure que, dans les conditions expérimentales décrites, le *L. lignosus* n'excrète pas de peroxydase et, en accord avec les définitions proposées par Schubert (*), que les phénoloxydases libérées sont des laccases.

Divers auteurs ont montré le rôle essentiel joué par ces enzymes dans la dépolymérisation de la lignine [(10), (11), (12) int.al./aun]. Il semble donc bien que c'est aux laccases que doit être imputée la responsabilité de la dégradation des racines attaquées par le *L. lignosus* et que, dans le cas de ce Champignon, le processus parasitaire mette en œuvre des phénoloxydases plutôt que des hydrolases.

Dans ces conditions il semble que, parmi les trois formes mycéliennes constitutives du thalle du *L. lignosus*, la forme A doit, seule, être infectieuse puisque seule elle libère les enzymes efficaces. Le mycélium de type B assure l'extension rapide du thalle à la surface de l'hôte. Quant aux structures agrégées, bien que non infectieuses selon des critères purement biochimiques, elles permettent au Champignon de progresser de souche en souche assurant ainsi l'extension du parasite.

Si l'on compare les résultats que nous venons de présenter à ceux que nous avons obtenus au cours d'une étude analogue concernant le *C. rolfsii*, deux conclusions s'imposent :

— le *C. rolfsii* n'excrète que des hydrolases et se révèle incapable de coloniser les organes lignifiés. En revanche le *L. lignosus* libère essentiellement des phénoloxydases responsables de la dépolymérisation de la lignine. La différence de comportement *in vivo* des deux agents pathogènes peut donc, dans une large mesure, être expliquée par la nature particulière des enzymes qu'ils libèrent respectivement *in vitro*;

— sur le plan du parasitisme la spécialisation des éléments homologues du thalle des deux champignons est identique, le pouvoir pathogène semble détenu par les hyphes de type A chez le *L. lignosus* et latérale chez le *C. rolfsii*).

(*) Séance du 8 décembre 1976.

- (¹) C. BOISSON, *Comptes rendus*, 266, série D, 1968, p. 1112.
(²) C. BOISSON, *Comptes rendus*, 267, série D, 1968, p. 1435.
(³) M. GOUJON, *Comptes rendus*, 263, série D, 1966, p. 1965.
(⁴) M. GOUJON, *Comptes rendus*, 264, série D, 1967, p. 261.
(⁵) J. P. GEIGER, *Comptes rendus*, 275, série D, 1972, p. 1879.
(⁶) A l'exception de ce dernier, tous les milieux de culture sont constitués par un bouillon de Haricot (¹²).
(⁷) C. LANCE, *Thèse Doctorat d'État* n° 4063, Paris, 1963.
(⁸) O. H. LOWRY, N. J. ROSEBROUGH, R. J. FARR et R. J. RANDALL, *J. Biol. Chem.*, 193, 1951, p. 265.
(⁹) W. SCHUBERT, *Lignin Biochemistry*, 1965, Academic Press, New York, London.
(¹⁰) T. K. KIRK et A. KEIMAN, *Phytopathology*, 55, 1965, p. 739.
(¹¹) T. K. KIRK, J. M. HARKIN et E. B. COWLING, *Biochem. Biophys. Acta*, 165, 1968, p. 145.
(¹²) T. K. KIRK, *Ann. Rev. Phytopathology*, 9, 1971, p. 185.
(¹³) Il s'agit d'un bouillon de Haricot préparé en autoclavant, durant 20 mn, 400 g de filets de Haricot dans 1 l d'eau. Le bouillon est filtré sur coton, réajusté à 1 l, réparti suivant les besoins et stérilisé.

*Laboratoire de Phytopathologie
du Centre ORSTOM d'Adiopodoumé,
B.P. n° V.51,
Abidjan,
Côte-d'Ivoire;*

*Laboratoire de Morphologie expérimentale végétale
associée au C.N.R.S.,
Faculté des Sciences,
91405 Orsay.*