

MYCOLOGIE. — *Étude de deux peroxydases différentes extraites des tissus racinaires d'Hévéas sains et parasités par Leptoporus lignosus (Kl.) Heim.* Note (\*) de **Jean-Paul Geiger** et **Maurice Goujon**, présentée par M. Roger Gautheret.

L'étude *in vivo* des enzymes extractibles des tissus sains et des tissus envahis par le *L. lignosus* permet de mettre en évidence certaines différences dans les tissus racinaires de l'*Hevea brasiliensis*. Il est possible en particulier de constater au sein des tissus parasités, l'existence d'une peroxydase spécifique, différente par le poids moléculaire et le comportement en présence d'ions  $Ca^{++}$  de ses isoenzymes présentes dans les tissus sains. La biosynthèse de cette enzyme résulte de l'agression du Champignon. Elle est, selon toute vraisemblance, fonction de l'activité cellulaire de l'hôte et constitue peut-être une réaction défensive de ce dernier.

*The in vivo study of peroxidases extractible from both healthy tissues and tissues contaminated by L. lignosus shows clearly some differences between the root tissues of Hevea brasiliensis. In particular, one can notice, within contaminated tissues, the existence of a specific peroxidase, which differs, by the molecular weight and its activity in the presence of  $Ca^{++}$  ions, from its isoenzymes present in healthy tissues. The biosynthesis of this enzyme results from the fungal aggression. It is most probably function of host cellular activity and forms perhaps a defensive reaction of the latter.*

Lors de recherches précédentes (1) nous avons montré que le *L. lignosus* libère *in vitro* deux laccases très probablement responsables de la dépolymérisation de la lignine (2). Par la suite, nous avons retrouvé ces enzymes *in vivo* dans les tissus racinaires des Hévéas envahis par ce parasite (3). Contrairement aux laccases qui ne sont décelables qu'au sein des tissus parasités, des peroxydases peuvent être caractérisées dans les zones saines comme dans les régions nécrosées. Cependant, si dans les deux cas, la chromatographie sur colonne de DEAE-cellulose permet de séparer trois fractions, le pourcentage de l'activité de ces fractions par rapport à l'activité globale extractible diffère selon que le Champignon est ou non présent (3).

Ces observations pourraient traduire simplement une variation quantitative de la biosynthèse de ces différentes isoperoxydases. Nous nous sommes efforcé de le vérifier en évaluant le poids moléculaire et le comportement en présence d'ions  $Ca^{++}$  de la fraction P<sub>2</sub> qui semble jouer un rôle privilégié au moment de l'infection. A cet effet des extraits de tissus sains et parasités ont été purifiés sur DEAE-cellulose selon une méthode déjà décrite (3). Les fractions les plus actives rassemblées puis concentrées en un volume d'environ 1,5 ml sont additionnées de 4 mg de cytochrome C (Cyt. C), 1 mg d'alcool déshydrogénase de levure (ADH) et ajoutées à une solution constituée par 0,15 ml de solution saturée de « Blue dextran 2 000 » (BD) complétée par 25 µl d'une solution de *p*-nitrophénol. Ce mélange est déposé au sommet d'une colonne de gel de « Sephadex G 200 » (Ø = 1,8 cm : H = 85 cm) préalablement équilibrée dans un tampon Tris-HCl 0,025 M, pH = 7,5, KCl 0,1 M. L'éluion est effectuée à l'aide de ce même tampon le débit étant réglé à 10 ml/h. L'éluat est recueilli par fractions de 1,7 ml environ.

La colonne est étalonnée au moyen des marqueurs suivants : « Blue dextran 2 000 », pyruvate kinase (PK) de muscle de Lapin (PM : 237 000), aldolase (Ald.) de muscle de Lapin (PM : 154 000), alcool déshydrogénase de levure [PM : 126 000 (4)], malate déshydrogénase (MDH) de cœur de Porc (PM : 70 000), peroxydase (Peroxy.) de raifort [PM : 49 000 (4)], Cyt. C de cœur de Cheval (PM : 12 400) et *p*-nitrophénol. « Blue dextran », Cyt. C et *p*-nitrophénol sont dosés par spectrophotométrie respectivement à 625, 400 et 420 nm. A l'exception de la MDH (DO à 230 nm), les enzymes sont détectées grâce à leur activité catalytique.

26 AOUT 1977

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

Collection de Références

n° 8635 PZ A

ex 1

CR

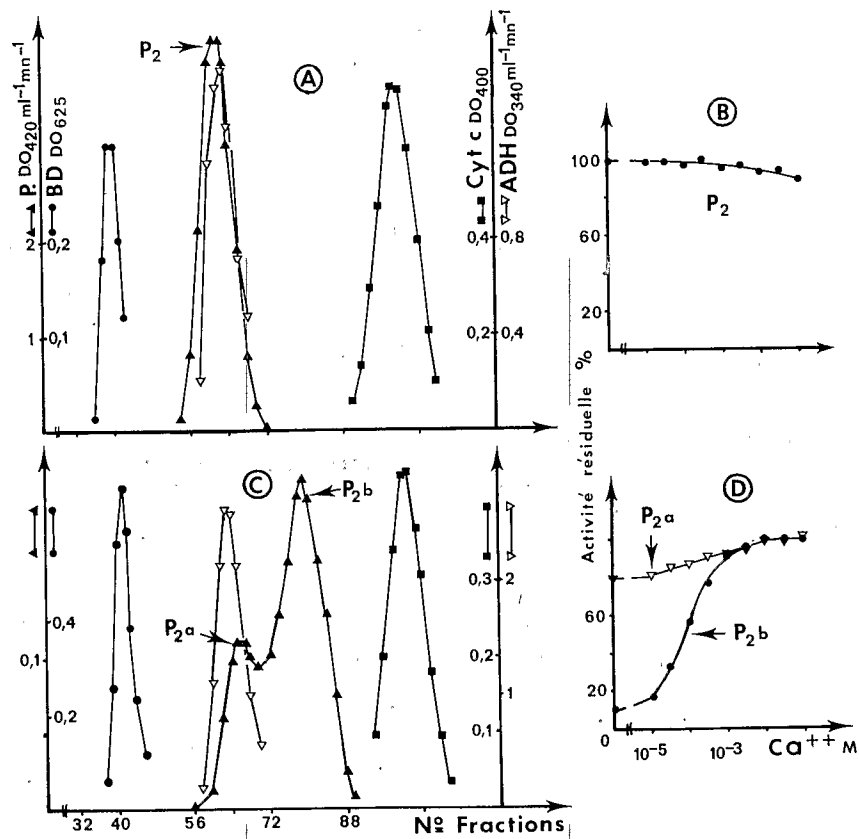


Fig. 1

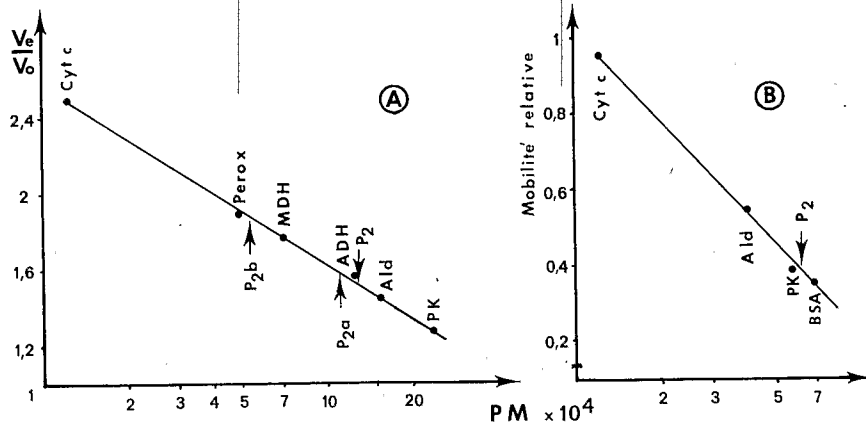


Fig. 2

Fig. 1. — (A) Filtration sur gel de « Sephadex G 200 » d'un extrait de tissus parasités préalablement purifié (fraction P<sub>2</sub> isolée par chromatographie sur DEAE-Cellulose). (B) Activité de la peroxydase P<sub>2</sub> en fonction de la concentration en CaCl<sub>2</sub>. (C) Filtration sur « G 200 » d'un extrait de tissus sains (fraction P<sub>2</sub> purifié sur DEAE-Cellulose). (D) Activité des peroxydases P<sub>2a</sub> et P<sub>2b</sub> en fonction de la concentration en ions calcium.

Fig. 2. — (A) Détermination du poids moléculaire des peroxydases P<sub>2</sub> (tissus parasités), P<sub>2a</sub> et P<sub>2b</sub> (tissus sains) par filtration sur « G 200 ». (B) Détermination du poids moléculaire des sous-unités de la peroxydase P<sub>2</sub> par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en conditions dissociantes (SDS).

Enfin la détermination du PM en conditions dissociantes est effectuée par électrophorèse sur gel de polyacrylamide (7,5 %) en présence de dodécylsulphate de sodium (SDS 0,1 %) selon la méthode de Weber et coll. <sup>(5)</sup>, les échantillons étant préalablement traités durant 2 mn à 100° par du SDS et du mercaptoéthanol à 1 %. Les marqueurs utilisés sont le sérum albumine bovine (BSA; PM : 68 000), la pyruvate kinase (PM : 57 000), l'aldolase (PM : 40 000) et le cytochrome C (PM : 12 400).

Les résultats que nous avons obtenus sont présentés dans les figures 1 et 2.

On remarque que la fraction peroxydasique  $P_2$ , obtenue par chromatographie sur DEAE-cellulose d'extraits de tissus sains, comporte en fait deux isoenzymes  $P_{2a}$  et  $P_{2b}$  (fig. 1 C). Cependant un tel diagramme d'éluion n'est pas obtenu de façon systématique. En effet le pic  $P_{2a}$  peut, d'une expérience à l'autre, soit faire complètement défaut, soit se réduire à un simple épaulement. Ces variations sont peut-être liées au génome des pivots car les porte-greffes, issus de fécondations illégitimes, ne sont pas génétiquement identiques, peut-être aussi proviennent-elles de différences dans l'état physiologique des tissus résultant du temps écoulé entre l'abattage et le prélèvement ou encore d'effets secondaires de l'infection par le *L. lignosus*. Ce qu'il convient en tous cas de noter c'est que la fraction  $P_2$  purifiée à partir des tissus parasités est toujours éluee sur « G 200 » en un pic unique (fig. 1 A).

La filtration sur « G 200 » permet d'estimer le poids moléculaire des peroxydases  $P_2$  (tissus parasités),  $P_{2a}$  et  $P_{2b}$  (tissus sains) respectivement à environ 128 000, 108 000 et 51 000 [il s'agit de PM apparents pouvant différer des PM réels <sup>(4)</sup>, <sup>(6)</sup>]. Malgré une certaine imprécision inhérente à la technique utilisée les poids moléculaires des enzymes  $P_2$  et  $P_{2a}$  paraissent significativement différents puisque les expériences de co-chromatographie révèlent que la première est éluee légèrement avant l'alcool déshydrogénase, la seconde légèrement après cette même enzyme (fig. 1 A et 1 C).

Nous avons également essayé de savoir si la peroxydase  $P_2$  pouvait être constituée de sous-unités de même poids moléculaire que l'enzyme  $P_{2b}$ . L'électrophorèse en conditions dissociantes montre que l'enzyme  $P_{2a}$ , extraite des tissus parasités est composée de deux sous-unités vraisemblablement identiques (la coloration au bleu de Coomassie ne permet de révéler qu'une seule bande, quoique relativement diffuse) ayant un poids moléculaire voisin de 61 000 (fig. 2 B). Il en résulte que l'enzyme native serait de type  $A_2$  et que la sous-unité diffère très vraisemblablement de la protéine  $P_{2b}$  de poids moléculaire relativement plus faible.

Enfin une autre différence entre les trois peroxydases réside dans l'effet du calcium sur leur activité catalytique. L'activité de l'enzyme  $P_2$  des tissus parasités est totalement indépendante de ces ions (fig. 1 B). En revanche la vitesse de réaction de l'enzyme  $P_{2b}$  (tissus sains) n'est maximale qu'en présence d'ions calciques à une concentration supérieure à  $10^{-3}$  M (fig. 1 D), tandis que celle de la peroxydase  $P_{2a}$  est faiblement dépendante du calcium (fig. 1 D); encore peut-on penser qu'il s'agit dans ce dernier cas d'un *artefact* dû à une légère contamination de la fraction  $P_{2b}$  (fig. 1 C).

L'ensemble de ces informations nous conduit à penser que la peroxydase  $P_2$  indécélable dans les tissus sains est spécifique des tissus parasités. Dans l'état actuel de nos connaissances il est impossible de préciser si la synthèse de cette enzyme doit être attribuée à l'hôte ou au parasite. Il convient néanmoins de rappeler d'une part que, *in vitro*, le *L. lignosus* ne libère pas de peroxydase alors qu'il excrète des laccases et, d'autre part, que l'augmentation de l'activité peroxydasique est un phénomène général chez les végétaux subissant une agression d'origine virale, bactérienne ou fongique. Aussi, bien qu'aucun argument

décisif ne puisse être avancé, on peut estimer que la peroxydase  $P_2$  des tissus parasités est synthétisée par l'Hévéa.

Enfin, si le rôle de cette peroxydase ne peut, pour l'instant, être précisé, on ne peut cependant exclure, à la lumière de certaines données acquises sur des systèmes hôte-parasite différents (7), une éventuelle participation de cette enzyme aux réactions de défense de l'hôte.

(\*) Séance du 8 décembre 1976.

(1) J. P. GEIGER, *Physiol. vég.*, 13, (2), 1975, p. 307.

(2) T. K. KIRK, *Ann. Rev. Phytopathology*, 9, 1971, p. 185.

(3) J. P. GEIGER, D. NANDRIS et M. GOUJON, *Physiol. vég.*, 14, (2), 1976, p. 271.

(4) P. ANDREWS, *Biochem. J.*, 91, 1964, p. 222.

(5) K. WEBER, J. R. PRINGLE et M. OSBORN in *Methods in Enzymology*, XXVI, S. P. COLOWICK et N. O. KAPLAN, éd., Academic Press, 1972, p. 3.

(6) H. A. STAFFORD et S. BRAVINDER-BREE, *Plant. Physiol.*, 49, 1972, p. 950.

(7) T. OHGUCHI et Y. ASADA, *Physiol. Pl. Path.*, 5, 1975, p. 183.

*Laboratoire de Phytopathologie de l'O R S T O M ,  
Centre d'Adiopodoumé,  
B.P. n° V.51,  
Abidjan,  
Côte-d'Ivoire;  
et  
Laboratoire de Morphologie expérimentale,  
associé au C.N.R.S.,  
Faculté des Sciences,  
91405 Orsay.*