

ORSTOM

INSTITUT FRANCAIS DE RECHERCHE SCIENTIFIQUE POUR LE DEVELOPPEMENT
EN COOPERATION

**ULTRASTRUCTURE DU PHLOEME D'HEVEA
ATTEINT DE NECROSE**

PAR

NICOLE M., THOUVENEL J.C., GIANNOTTI J.,

ET

CHRESTIN H., GEIGER J.P., NANDRIS D., RIO B.

RAPPORT DE SYNTHESE SUR LES ASPECTS MICROSCOPIQUES DE LA NECROSE DE
L'HEVEA REALISE DANS LE CADRE DE LA CONVENTION ORSTOM - SOGB (1984-1986).

JUILLET 1987.

Centre ORSTOM d'Adiopodoumé, BP V 51 ABIDJAN, COTE D'IVOIRE

REÇU LE...03/11/87
REPONDU LE.....

27 MARS 1995

O.R.S.T.O.M. Fonds Documentaire

N° : 41438

Date : B P12 M

La nécrose du phloème d'*Hevea brasiliensis* suscite un vif intérêt dans le monde scientifique à la mesure de l'inquiétude qui existe dans le monde des planteurs; elle a d'ailleurs conduit, dans les deux ans passés, à la mise en place d'un dispositif d'étude, réalisé sur la base d'une convention établie entre la SOGB et l'ORSTOM. Parmi les objectifs fixés dans le cadre de cette convention, la recherche d'un agent pathogène susceptible de provoquer les symptômes caractéristiques de la nécrose du phloème (NANDRIS et coll., 1984), constitua l'une des priorités majeures. L'observation histologique et ultrastructurale des tissus malades est l'une des voies d'approches retenue, devant permettre la mise en évidence d'un tel agent causal. Une expérimentation microscopique a donc été mise en oeuvre au travers des infrastructures de l'ORSTOM, du GERME (Groupe d'Etudes et de Recherches en Microscopie Electronique) et du laboratoire de Zoologie de l'Université de Dakar.

Le but de cette note est de présenter la synthèse des observations microscopiques du phloème nécrosé; elle expose les résultats obtenus dans un contexte uniquement pathologique et non pas dans l'optique d'une étude histologique classique. De ce fait, les anomalies caractéristiques (thyllosoïdes, coagulation interne du caoutchouc.....) d'un phloème d'Hévéa agressé (saignée, encoche sèche ou traitement chimique) ne seront que mentionnées, alors que les phénomènes de dégénérescence cellulaire, attribuables au processus de nécrose, occuperont une place plus conséquente.

MATERIELS ET METHODES

Les échantillons, dont les caractéristiques des arbres de provenance sont reportées dans le tableau ci-dessous, ont été

prélevés à trois périodes distinctes de l'année, de Mars 1984 à Avril 1986, recouvrant ainsi la saison sèche après l'hivernage des arbres (Mars-Avril), la saison des pluies (Juillet) et la période avant la dé-

	CLONE	PARCELLE	QUANTITE	AGE(ans)
ARBRES MALADES	GT1	Heke 25	5	11
		Singhe 78	2	7
	PB 235	Baco 30	10	8
		TOTAL	17	
ARBRES SAINS	GT1	Heke 25	1	11
		Singhe78	1	7
		Kaco 90	2	7
	PB 235	Baco 30	3	8
		Dole 16	2	4
	PB 217	Baco 17	2	4
	Polyclone	Heke 29	2	4
	TOTAL	13		

Ultrast. Nec. Phloème Hév. par NICOLE M., THOUVENEL J.C., GIANNOTTI J., CHRESTIN H., GEIGER J.P., NANDRIS D; et RIO B.

foliation (Décembre). Les échantillons soumis à l'examen microscopique ont été traités par les techniques classiques de préparation du matériel végétal. Avant la fixation des tissus malades et sains, le glutaraldéhyde (3%) est injecté dans le phloème de l'arbre, au niveau du site de prélèvement. Les échantillons sont ensuite prélevés à l'emporte-pièce et plongés, à froid, dans le fixateur durant 2 heures avant d'être fragmentés en morceaux de 1 à 3 mm³ puis à nouveau fixés. Après plusieurs lavages au tampon cacodylate 0,1 M pH=7,2 (24 h.), les échantillons sont postfixés à l'osmium (2% dans l'eau), lavés abondamment, progressivement déshydratés à l'alcool et inclus dans l'épon selon une technique décrite précédemment (NICOLE et coll., 1986). Les coupes ultrafines sont colorées à l'acétate d'uranyle puis au citrate de plomb avant d'être examinées sur microscopes Siemens Elmiskop 102 (GERME d'Abidjan) ou Elmiskop 101 (Université de Dakar).

QUELQUES RAPPELS D'HISTOLOGIE

Le phloème secondaire d'*Hevea brasiliensis* résulte du fonctionnement de l'assise génératrice libéro-ligneuse. C'est un tissu complexe, constitué de plusieurs types cellulaires parmi lesquels on peut citer:

- les laticifères: vaisseaux anastomosés, organisés en anneaux concentriques autour de l'axe de la plante;
- les cellules à tannins et les cellules parenchymateuses compagnes, associées aux laticifères;
- les tubes criblés, conducteurs de la sève élaborée;
- les cellules de pierre, aux parois sclérifiées;
- les cellules spécialisées dans la production de cristaux (ferritine, oxalate de calcium);
- les cellules constituant les rayons paren-

chymateux, interconnectés avec ceux du bois.

L'organisation de ces cellules se traduit, au sein du phloème, par la présence de deux zones distinctes, le phloème tendre et le phloème dur (figures 1 et 2).

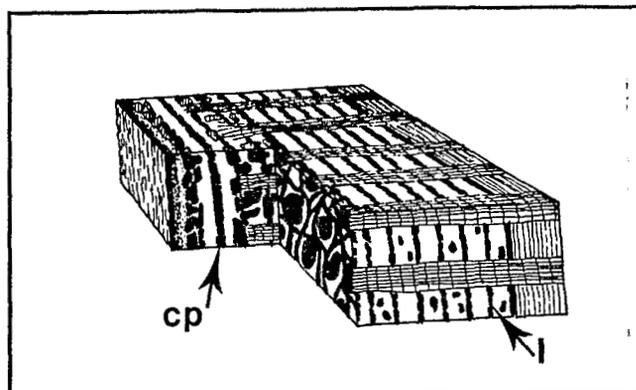


Figure 1: Schéma du phloème d'Hévéa; cp: cellules de pierre; l: laticifères.

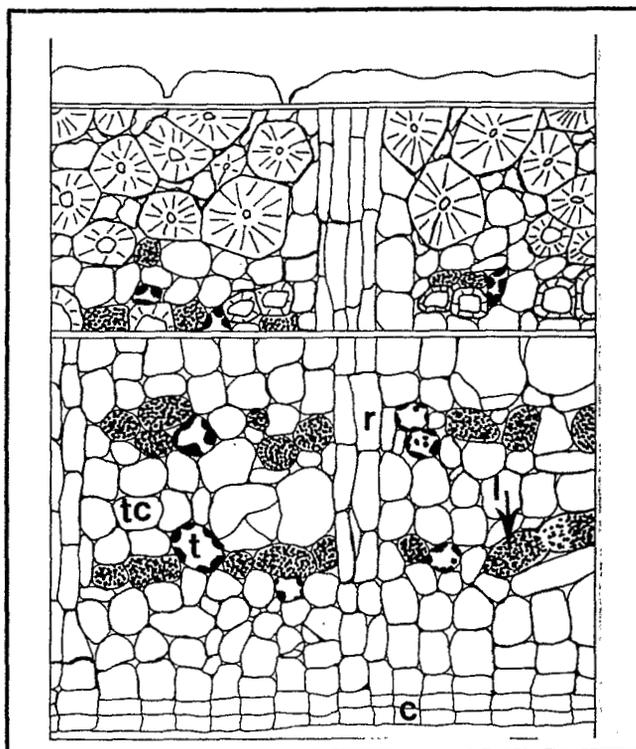


Figure 2: schéma d'une coupe transversale du phloème d'Hévéa; c: cambium; cp: cellules de pierre; l: laticifère; r: rayon parenchymateux; t: cellules à tannins; tc: tubes criblés.

Le phloème tendre renferme la frange conductrice ou nourricière (0,8 mm d'épaisseur), située à proximité du cambium et contenant les tubes criblés fonctionnels et peu de laticifères, puis la zone de saignée, riche en laticifères (figure 3).

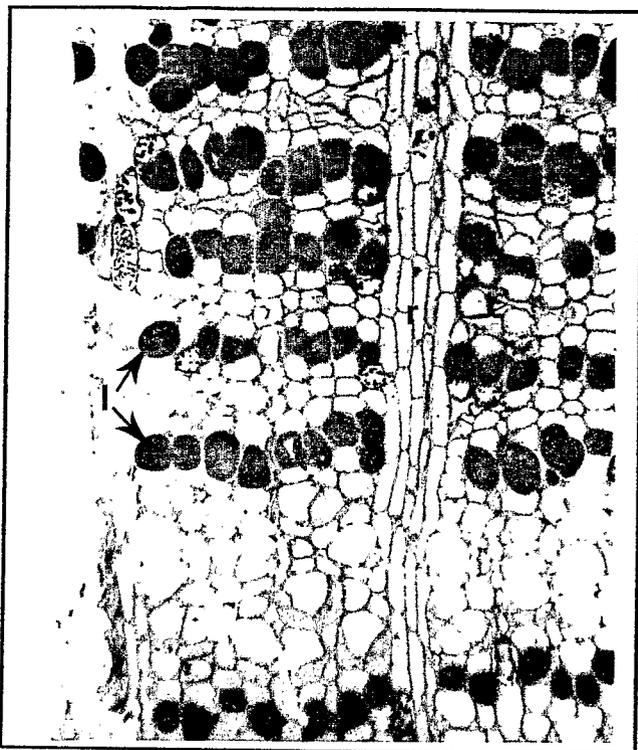


Figure 3: coupe transversale semi-fine dans le phloème tendre; l: laticifère; r: rayon parenchymateux.

Le phloème dur est principalement constitué de cellules de pierre; les vaisseaux et les tubes criblés n'y sont plus fonctionnels.

Au plan pathologique, l'examen histologique des tissus atteints de nécrose révèle la présence de structures apparentées aux thylosoïdes (figures 4 et 5), définis, d'après De FAY et HEBANT (1982), comme étant une évagination cytoplasmique se développant à l'intérieur d'un laticifère à partir d'une cellule voisine et qui, à terme, se lignifient. Les thylosoïdes, observés dans les tissus atteints de nécrose, semblent identiques à ceux décrits, chez l'Hévée, dans le cas de la maladie des encoches sèches, et

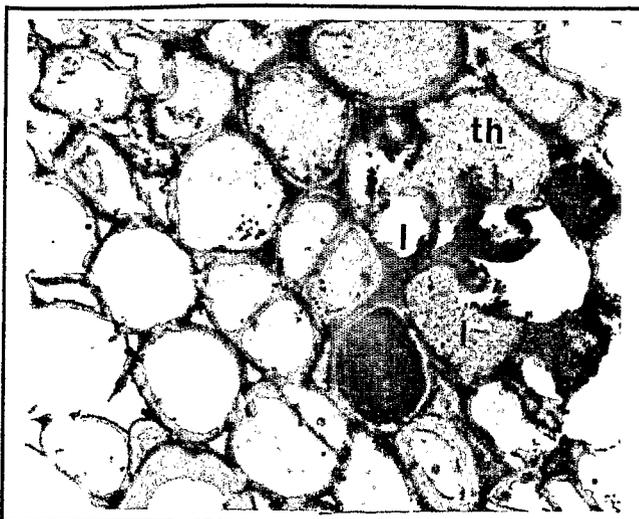


Figure 4: coupe transversale semi-fine: thylosoïde (th) se déversant dans un laticifère (l). (x 1250).



Figure 5: coupe transversale semi-fine: thylosoïde (th) et latex coagulé (flèche). (x 5000).

apparaissent, de ce fait, comme une manifestation aspécifique de la nécrose.

ULTRASTRUCTURE DU PHLOÈME NECROSE

L'examen au microscope électronique des tissus malades, par comparaison aux tissus sains prélevés sur des arbres présumés sains, a permis de mettre en évidence un certain nombre de modifications relatives à

l'organisation des cellules constitutives du liber. La description des faits, caractérisant un état de dégradation des cellules, concernera tout d'abord la paroi cellulosique et la lamelle moyenne, puis les systèmes membranaires, et, enfin, les laticifères. Un second point sera consacré aux structures "anormales" présentes dans les tissus infectés, mais jamais observées à ce jour dans les tissus sains.

Dégradation de la paroi cellulosique

Les différents aspects de la dégradation de la paroi : l'altération des parois est généralisée dans le liber atteint de nécrose, mais il ne semble pas que les mécanismes de dégradation épargnent certains types cellu-

lares. L'aspect des parois cellulaires varie cependant avec le stade de nécrose du phloème (lame brune ou nécrose avancée). Au stade "lame brune", il est fréquent d'observer une érosion de la paroi limitée à la portion proche de l'espace périplasmique. Un examen attentif des images montre, en effet, une désorganisation des fibres cellulosiques à ce niveau (figures 6 et 7).

Une telle perturbation se manifeste également dans les cribles des tubes conducteurs de la sève (figures 8 et 9). Des prélèvements réalisés dans un tissu plus dégradé, révèlent des facies plus accentués de l'altération de la paroi, puisque certaines d'entre-elles présentent de larges portions perforées (figure 10) ou totalement digérées (figures 11).

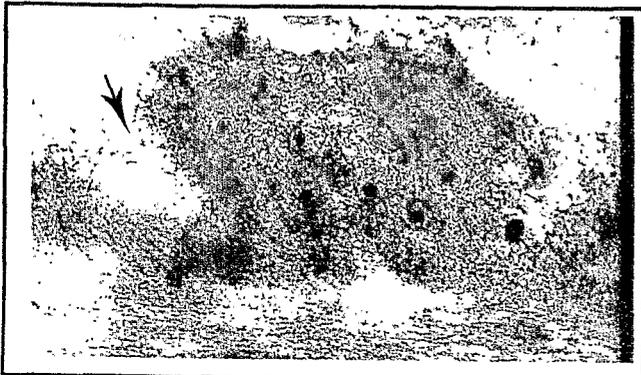


Figure 6: désorganisation des fibres de cellulose de la paroi cellulaire (flèche). (x 33 000).



Figure 7: désorganisation des fibres de celluloses de la paroi cellulaire (flèche). (x 30 000).



Figures 8 et 9: dégradation de la paroi au niveau des cribles des tubes conducteurs de la sève (flèches). (8: x 30 000; 9: x 50 000).



Figure 10: digestion partielle de la paroi cellulaire (flèche). (x 30 000).



Figure 11: digestion totale de la paroi cellulaire (flèche). (x 70 000).

Conséquence de la dégradation de la paroi cellulaire: la désorganisation des plasmodesmmes. L'érosion de la paroi au voisinage de l'espace périplasmique est également discernable au contact des plasmodesmmes, structures facilitant les échanges entre cellules limitrophes (figure 12). La figure 13 montre le début d'une telle érosion, qui, à un stade plus avancé, semble "libérer", en partie, les plasmodesmmes de la paroi (figures 14 et 15), qui, en coupe transversale, ont un aspect circulaire (figure 16) et un aspect tubulaire en coupe longitudinale (figure 17). Cette dégradation pro-

voque une diminution de la rigidité de la paroi conférant aux plasmodesmmes un facies souvent tortueux (figure 18).

Lorsque l'altération intéresse non seulement les bordures de la paroi, mais son ensemble, elle se traduit par une digestion totale des fibres cellulosiques autour des plasmodesmmes, créant ainsi un espace dans lequel "flottent" ces structures (figures 19 et 20). A terme, des portions entières de paroi, renfermant des plasmodesmmes, se détachent de l'armature de la cellule (figures 21 et 22).

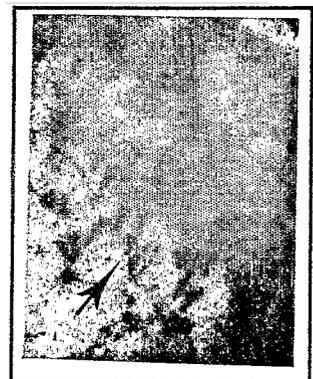
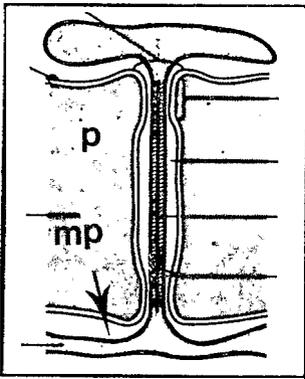


Figure 12: plasmodesme. mp: membrane plasmique; p: paroi.

Figure 13: digestion de la paroi près de plasmodesmmes (flèche). (x 19 000)

Figures 14 et 15: plasmodesmmes libérés dans l'espace périplasmique (flèches). (14: x 40 000; 15: x 20 000).

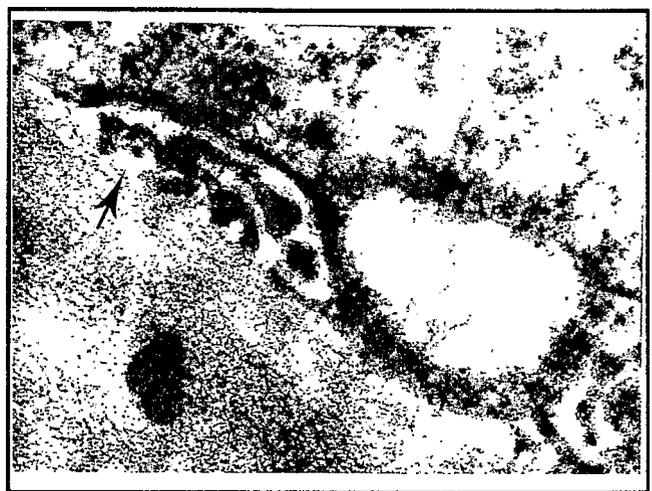


Figure 16: aspect circulaire des plasmodesmmes dans la paroi (flèche). (x 90 000).

Figure 17: aspect tubulaire des plasmodesmmes dans la paroi (flèche). (x 105 000).

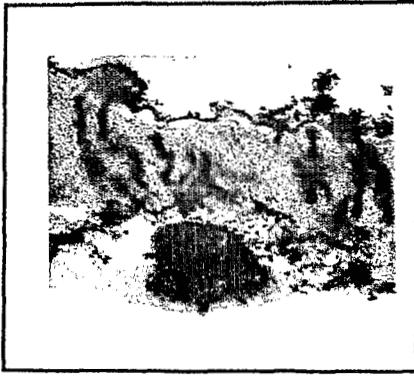


Figure 18: aspect tortueux des plasmodesmes dans la paroi cellulaire. (x 35 000).

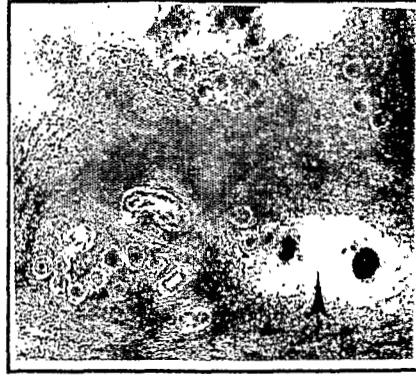


Figure 19 : dégradation de la paroi autour des plasmodesmes (flèche). (x 40 000).

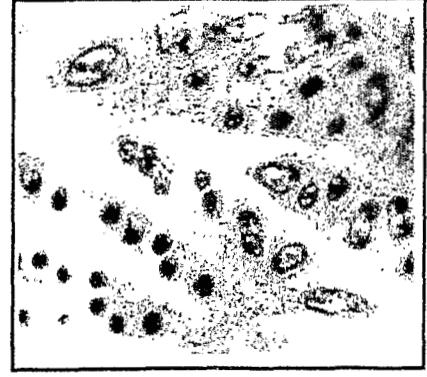


Figure 20: plasmodesmes intacts dans une paroi non dégradée. (x 60 000).



Figure 21: portions de parois contenant des plasmodesmes et se détachant de la paroi cellulaire (flèche). (x 15 000).



Figure 22: agrandissement de la photo précédente montrant le même phénomène. (x 40 000).

Dégradation de la lamelle moyenne

Le ciment intercellulaire n'est pas épargné par le processus nécrotique; son altération est en effet conjointe à celle de la paroi cellulosique (figures 23 et 24). L'aspect spectaculaire de cette dégradation, visualisé par la figure 25, suggère fortement l'intervention de mécanismes chimiques, susceptibles d'expliquer les dégâts causés à la lamelle moyenne.

Dégradation des systèmes membranaires

L'examen des cellules d'un phloème atteint

de lames brunes montre également des perturbations des systèmes endomembranaires et tout particulièrement de la membrane plasmique. Dans les cellules parenchymateuses compagnes ou des rayons, le plasmalemma se désagrège en petites vésicules localisées près de la paroi. Celles-ci peuvent être soit éparses, souvent associées aux fibres pariétales (figure 26), soit plus ou moins regroupées, associées à d'autres fragments membranaires (figures 27 et 28).

Certaines coupes révèlent par ailleurs des structures analogues aux plasmalemmes dont la formation pourrait également résulter de la dégradation de la mem-

brane plasmique (figure 29). Dans le cytoplasme, les membranes des organites présentent de même des signes de dégénérescence. Certaines, comme celles du noyau, sont totalement éclatées (figures 30 et 31).

En règle générale, la dégradation des membranes s'accompagne d'une dégénérescence du cytoplasme, dont l'une des caractéristiques est l'accumulation de particules osmiophiles intracytoplasmiques ou localisées dans l'espace périplasmique (figures 32 et 33).

Dégradation du réseau laticifère

Outre les modifications intervenant au niveau des parois, les laticifères subissent un bouleversement profond de leur organisation cellulaire, qui conduit à la coagulation interne du latex (figures 34 et 35) et, par conséquent à l'arrêt de sa production. Les aspects microscopiques de cette coagulation ne diffèrent apparemment pas de ceux décrits dans les maladies à pourridié (NICOLE et coll., 1986).



Figure 23: altération de la lamelle moyenne (flèche). (x 45 000).

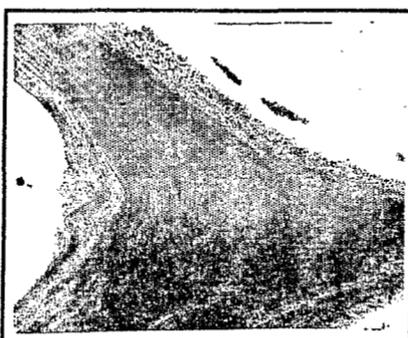


Figure 24: lamelle moyenne non altérée dans un tissu sain (flèche). (x 20 000).

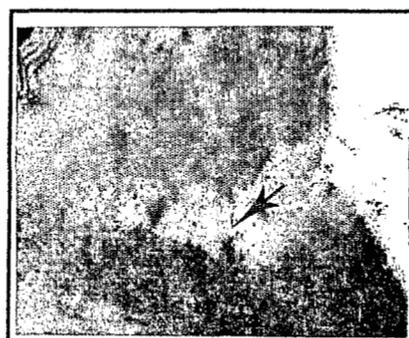


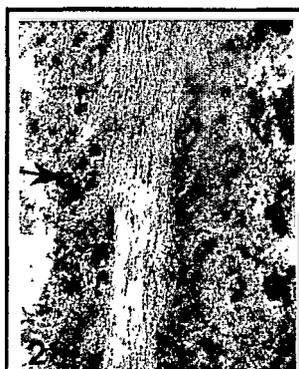
Figure 25: altération de la lamelle moyenne (flèche). (x 16 000).



26



27



28



29

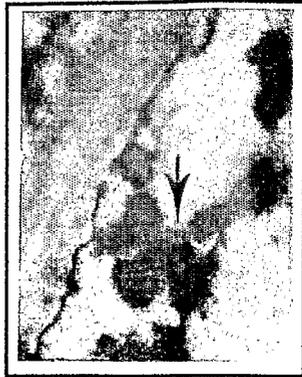


30



31

Figure 26: vésicules pariétales (flèches). (x 40 000).
 Figure 27: vésicules plasmalémiques éparses (flèches). (x 25 000).
 Figure 28: vésicules associées à des fibres pariétales (flèches). (x 40 000).
 Figure 29: regroupement de vésicules (flèche). (x 55 000).
 Figure 30: éclatement des membranes d'un noyau (flèche). (x 18 000).
 Figure 31: noyau intact dans une cellule d'un tissu sain. (x 20 000).



Figures 32 et 33: accumulation de particules osmiophiles dans l'espace périplasmique (flèches). (32: x 30 000); 33: x 30 000).

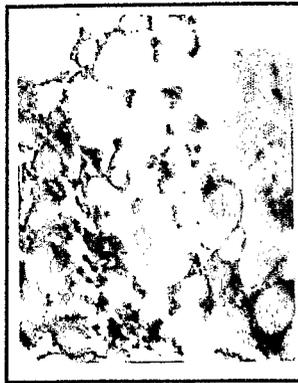


Figure 34: coagulation interne du latex. (x 17 000).

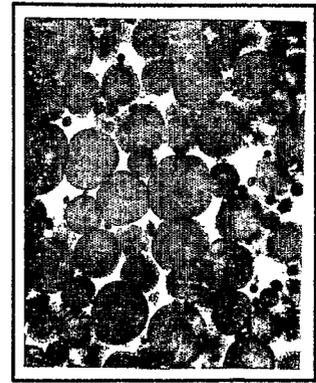


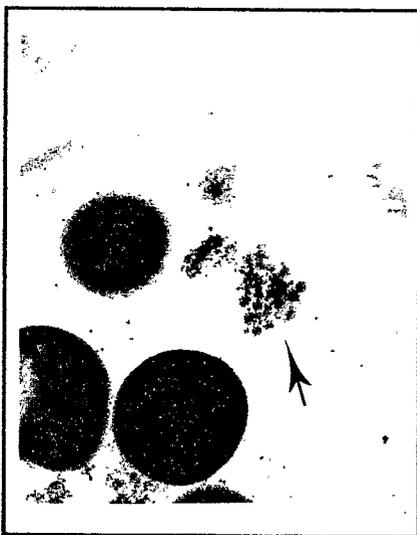
Figure 35: latex non coagulé. (x 12 500).

Structures anormales dans les tissus infectés

Certaines structures atypiques ont été observées dans les tissus malades, sans qu'elles aient pu être décrites dans les tissus sains, ou présenter une quelconque relation avec les organites habituels de la cellule.

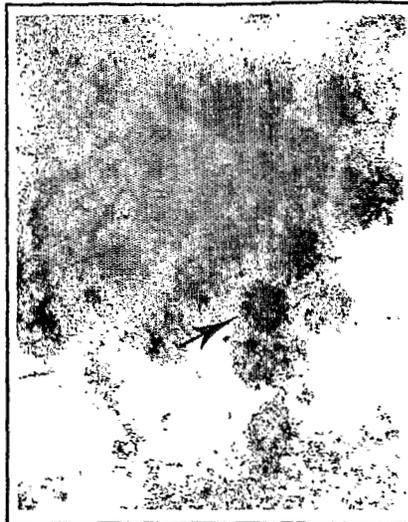
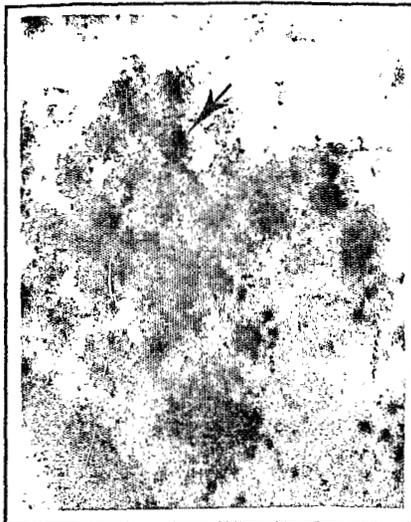
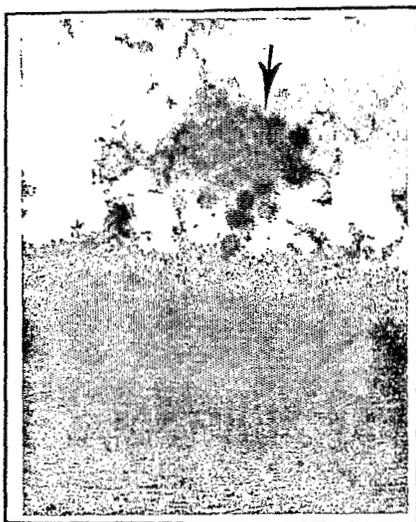
Certaines structures ont une morphologie très homogène, d'aspect circulaire, granuleux et osmiophile, souvent regroupées au voisinage de la membrane plasmique (figures 36, 37 et 38). Un examen atten-

tif à un grossissement supérieur, permet de distinguer une membrane délimitant un territoire plus ou moins osmiophile (figures 39, 40 et 41). Dans certains cas, elles sont associées à des fibrilles de nature vraisemblablement protéique. Si les structures précédentes, sans être fréquentes, ont été observées dans plusieurs cas, d'autres, en revanche sont plus rares. C'est ainsi que certaines semblent strictement localisées dans la lamelle moyenne (figure 42) ou dans l'espace périplasmique (figure 43), flanquées contre la paroi cellulosique. Leur morphologie est mal définie.



Figures 36 et 37: groupe de particules circulaires osmiophiles (flèche). (36: x 30 000; 37: x 40 000).

Figure 38: particules isolées (flèches). (x 40 000).



Figures 39, 40 et 41: particules osmiophiles circulaires, délimitées par une membrane (flèches). (39: x 40 000; 40: x 70 000, 41: x 100 000).



Figure 42: structures de type membranaire localisées dans la lamelle moyenne. (x 45 000).



Figure 43: structures de type membranaire localisées dans l'espace périplasmique. (x 45 000).

DISCUSSION

Le but initial de l'approche cellulaire des recherches menées sur la nécrose du phloème d'Hévéa était de caractériser la présence d'un éventuel microorganisme susceptible d'être l'agent causal de la maladie.

Dix-sept arbres atteints de nécrose (par comparaison aux 13 arbres sains ou présumés sains) ont été retenus pour

l'examen microscopique, et tous les types cellulaires, distribués entre le cambium et la zone pierreuse du phloème, ont été soumis à l'observation minutieuse. A ce jour, aucun organisme étranger à l'Hévéa n'a pu être identifié dans le phloème malade. Les germes de type fongique et bactérien sont très certainement à exclure en tant qu'agent causal du syndrome, à l'inverse des virus et des mycoplasmes dont la présence au sein de tissus malades est souvent transitoire.

Signalons toutefois, que dans deux cas précis d'arbres l'un atteint de nécrose et l'autre apparemment sain, et présentant des symptômes foliaires, des particules filamenteuses d'aspect viral ont été observées sur extrait brut de feuilles. Aucune relation avec la nécrose n'a cependant encore pu être faite.

L'examen des échantillons en microscopie optique a été sur des coupes semi-fines à partir de prélèvements inclus dans la résine. Il a permis de détecter la présence de structures morphologiques apparentées aux thyllosoïdes et identiques à celles décrites dans le cas de la maladie dite "des encoches sèches de surexploitation". L'intérêt de cette observation réside dans le fait qu'elle ait été effectuée dans le système racinaire d'un arbre malade qui présentait, à ce niveau, le symptôme typique de la lame brune, décrit dans le rapport précédent. Ce résultat démontre que la présence de thyllosoïdes se manifeste également dans le phloème d'arbres atteints de maladies autres que celle de l'encoche sèche, et suggère que les thyllosoïdes devraient être considérés non plus comme un critère de l'encoche sèche, mais probablement comme l'une des conséquences d'une affection du phloème d'Hévéa dont le réseau laticifère présente de profondes perturbations, et ce quelles qu'en soient les causes.

A l'échelle ultrastructurale, si aucun résultat n'a été acquis au plan de la recherche d'un éventuel agent pathogène causal, les observations, effectuées simultanément par les chercheurs de l'ORSTOM et par un pathologiste de l'INRA, confirment, en revanche, la désorganisation des structures cellulaires. Citons:

- l'érosion de la paroi cellulaire, tout particulièrement au niveau des plasmodesmes, qui à terme, se trouvent dispersés dans un espace périplasmique ainsi créé;
- la dégradation importante de la paroi cellulosique et de la lamelle moyenne;

- la dégénérescence du contenu cellulaire, comme par exemple la rupture du plasmalemme ou de la membrane nucléaire, ainsi que l'accumulation de particules osmophiles dans le cytoplasme, et, enfin la coagulation interne du latex dans les laticifères.

La dégradation des structures endomembranaires s'explique aisément par la décompartmentation des systèmes enzymatiques hydrolytiques et oxydatifs, provoquée par la déstabilisation de l'organisation de la cellule. Une dislocation du plasmalemme avec libération de vésicules, associée à plusieurs activités enzymatiques, a de même été rapportée dans la différenciation des laticifères d'autres plantes (GIORDANI, 1980 et 1981).

L'altération plus ou moins profonde de la paroi cellulosique serait vraisemblablement la résultante de l'action de cellulases qui, endogènes à l'Hévéa (SHELDRAKE et MOIR, 1979), participent activement au(x) mécanisme(s) d'anastomose des laticifères dans les arbres sains. Une stimulation de l'activité de telles enzymes, déclenchée par le processus nécrotique, peut favoriser l'autolyse des tissus.

La digestion de la lamelle moyenne, qui dans le phloème est essentiellement composée de matières pectiques, soulève par contre le problème de la nature de son altération. Aucun des dosages enzymatiques réalisés ultérieurement n'a permis de révéler dans les tissus malades (et sains), une quelconque activité de type pectinolytique, à laquelle la dégradation de la lamelle moyenne puisse être attribuée. Au stade actuel des résultats acquis, trois hypothèses peuvent être formulées pour expliquer ces observations microscopiques:

- les enzymes pectiques responsables de la dégradation de la lamelle moyenne sont d'origine exogène; l'agent qui les excrète n'ayant pas encore été caractérisé.
- il existe chez l'Hévéa une (ou plusieurs) pectinase(s) endogène(s) dont l'activité ne

peut être dosée par les techniques usuelles. De telles enzymes existent en effet dans les laticifères non articulés d'autres plantes (WILSON et coll., 1976; ALLEN et NESSLER, 1984). Dans un contexte d'agression, elle pourrait participer, tout comme les cellulases, à l'autolyse des tissus;
- il existe une activité pectinolytique non enzymatique, induite par les perturbations du phloème.

En résumé, l'examen microscopique des échantillons prélevés sur les 17 arbres malades a montré l'absence de microorganismes dans le phloème infecté, la désorganisation et l'oxydation des tissus atteints de nécrose, la dégradation et la déstabilisation du contenu de la majorité des types cellulaires constitutifs du phloème.

Si l'on excepte la dégradation de la lamelle moyenne, les résultats rapportés ici

ne présentent aucun caractère de spécificité. En revanche, la dégradation de ciment intercellulaire pourrait constituer le seul élément que l'étude histo-cytologique puisse fournir dans la recherche d'un agent pathogène potentiel intervenant dans la maladie.

Au plan ultrastructural, il s'agira, à moyen terme, de poursuivre les observations microscopiques des tissus malades. En outre, des expérimentations cytochimiques complémentaires devraient nous renseigner quant à l'existence d'éventuelles activités lytiques dans le but de vérifier leur relation avec les sites de dégradation décrit ci-dessus.

Enfin, l'absence d'indices cellulaires fondés, plaidant en la faveur d'une maladie d'origine pathologique, nous impose de conserver à l'esprit l'hypothèse probable d'un désordre de nature physiologique.

BIBLIOGRAPHIE

ALLEN R.D. et NESSLER C.L., 1984. - Cytochemical localization of pectinase activity in laticifers of *Nerium oleander* L. *Protoplasma*, 119, 74-78.

DE FAY E. et HEBANT C., 1980. - Etude histologique des écorces d'*Hevea brasiliensis* atteint de la maladie des encoches sèches. *Compte-rendus de l'Académie des Sciences, Paris, série D*, 291, 865-868.

GIORDANI R., 1980. - Dislocation du plasmalemme et libération de vésicules pariétales lors de la dégradation des parois terminales durant la différenciation des laticifères articulés. *Biologie cellulaire*, 38 (3), 231-236.

GIORDANI R., 1981. - Activités hydrolasiques impliquées dans le processus de dégradation pariétal durant la différenciation des laticifères articulés. *Biologie cellulaire*, 40 (3), 217-224.

NANDRIS D., CHRESTIN H., GEIGER J.P., NICOLE M. et THOUVENEL J.C., 1984 - Occurrence of a phloem necrosis on the trunk of rubber tree. *Conférence Internationale pour les 75 ans du Rubber Research Institute of Sri Lanka*, Sri Lanka, Septembre 1984, Colombo.

NICOLE M., GEIGER J.P. et NANDRIS D., 1986. - Ultrastructure of laticifer modifications in *Hevea brasiliensis* infected with root rot fungi. *Journal of Phytopathology*, 116, 259-268.

SHELDRAKE A.R. et MOIR G.F.J., 1970. - A cellulase in *Hevea latex*. *Physiologia Plantarum*, 23, 267-277.

WILSON K.J., NESSLER C.L. et MAHLBERG P.G., 1976. - Pectinase in *Asclepias latex* and its possible role in laticifer growth and development. *American Journal of Botany*, 63, 1140-1144.

Ultrast. Nec. Phloème Hévé. par NICOLE M., THOUVENEL J.C., GIANNOTTI J., CHRESTIN H., GEIGER J.P., NANDRIS D. et RIO B.