

APPROCHES BIOLOGIQUE ET ULTRASTRUCTURALE  
DES MODALITES DU PARASITISME DE *RIGIDOPORUS LIGNOSUS*  
ET *PHELLINUS NOXIUS* SUR *HEVEA BRASILIENSIS*

Michel NICOLE

# IDM 29

## ORSTOM

Editions de l'ORSTOM

INSTITUT FRANÇAIS DE RECHERCHE SCIENTIFIQUE  
POUR LE DÉVELOPPEMENT EN COOPÉRATION

*Collection :*

Travaux et documents microédités

PARIS 1988

ISBN · 2-7099-0900-6

© ORSTOM

« La loi du 11 mars 1957 n'autorisant, aux termes des alinéas 2 et 3 de l'article 41, d'une part, « que les «copies ou reproductions strictement réservées à l'usage privé du copiste et non destinées à une utilisation collective» et, d'autre part, que les analyses et les courtes citations dans un but d'exemple et d'illustration, «toute représentation ou reproduction intégrale, ou partielle, faite sans le consentement de l'auteur ou de ses ayants droit ou ayants cause, est illicite; » (alinéa 1er de l'article 40).

« Cette représentation ou reproduction, par quelque procédé que ce soit, constituerait donc une contrefaçon sanctionnée par les articles 425 et suivants du Code Pénal ».

# F 3

APPROCHES BIOLOGIQUE ET ULTRASTRUCTURALE DES  
MODALITES DU PARASITISME DE *RIGIDOPORUS LIGNOSUS*  
ET *PHELLINUS NOXIUS* SUR *HEVEA BRASILIENSIS*

---

Cet ouvrage a fait l'objet d'une thèse de troisième cycle soutenue en 1984 à l'Université de Toulouse.

## SOMMAIRE

INTRODUCTION GENERALE .....	4
MATERIELS BIOLOGIQUES ET METHODES .....	12
CHAPITRE I -	24
CHAPITRE II -	78
CONCLUSION GENERALE .....	98
BIBLIOGRAPHIE .....	103
TABLE DES MATIERES .....	121
PLANCHES PHOTOGRAPHIQUES .....	127

## RESUME

Les Basidiomycètes Polyporacées, *Rigidoporus lignosus* et *Phellinus noxius*, respectivement agent du pourridié blanc et agent du pourridié brun, provoquent des pourritures graves du système racinaire de l'arbre à caoutchouc, *Hevea brasiliensis*. Une étude fine des interactions hôte-parasite nécessite, avant tout, un strict contrôle de l'infection. Le chapitre premier décrit la réalisation, en conditions contrôlées, d'infections artificielles de jeunes Hévéa (clone GT1) par ces champignons (respectivement souches 1 et 4). L'acquisition de cet outil a favorisé les recherches histo-cytologiques de ces maladies. De ce fait, les modalités de l'agression de l'Hévéa par *R. lignosus* et *P. noxius*, exposées dans le second chapitre, sont élucidées tant au plan de la colonisation des tissus racinaires qu'au niveau de la désorganisation des structures hôtes. L'observation microscopique révèle la dégradation de l'ensemble des constituants des parois cellulaires par chaque parasite, de même que la déstabilisation du réseau laticifère causant la coagulation interne du caoutchouc. L'Hévéa répond cependant à ces attaques parasitaires par la mise en place de réactions de défense, initiées tout au long du processus infectieux. La plus remarquable, outre les phénomènes de lignification, de stimulation de l'activité cambiale ou de dépôts de callose, consiste en la différenciation de nouveaux tissus, épargnés par l'infection. La description de ces réactions ainsi que la discussion au sujet de leur rôle dans les interactions hôte-parasite sont rapportées dans le troisième chapitre.

## ABSTRACT

*Rigidoporus lignosus* and *Phellinus noxius*, are two Basidiomycetous soil root-rotting fungi causing severe damages in *Hevea brasiliensis* plantations. Host-parasite interactions were investigated at cellular level on infected plants. The first part of this paper deals with artificial inoculations on rubber-trees under controlled conditions while the second part contains microscopical observations on host aggression by each of these fungi, focusing on different stages of infection process ranging from root colonization to degradation of cell components. Major results concern penetration of hyphae, cell wall alterations and latex coagulation. Host defense is described in the third part of this presentation. Besides lignification, stimulation of cambium activity, wall thickening and callose deposition, the most remarkable reaction differentiated by *H. brasiliensis* is tissue neogenesis leading to compartmentalization of the infected root. The role of these reactions in pathogenesis is also discussed in this chapter.

INTRODUCTION GENERALE

Parmi les maladies fongiques affectant le système racinaire des espèces végétales ligneuses, les pourridiés, syndrome pathologique caractérisé par une atteinte du cortex racinaire et (ou) des tissus ligneux, constituent les attaques les plus graves enregistrées de par le monde.

L'agent causal parasite provoque une pourriture du bois ; il appartient à des genres très éloignés du point de vue taxonomique (*Armillariella*, *Coriolus*, *Fomes*, *Ganoderma*, *Phellinus*, *Polyporus*, *Poria*, *Rigidoporus*, *Rosellina*, *Trametes*, *Ustulina*, etc...). Dans la majorité des cas, cependant, ils sont classés parmi les Basidiomycètes (familles des Polyporaceae et des Agaricaceae).

En région tempérée, le genre *Fomes* sévit de manière importante. En France (DELATOUR, 1977) et en Grande Bretagne (GREIG, 1976), *Fomes annosus* (Fr.) Cke infecte plus de trente espèces ligneuses dont de nombreuses gymnospermes ; aux Etats-Unis, c'est un parasite grave de *Pinus resinosa* Sol. (SHIGO, 1975). *Armillariella mellea* (Vahl) Quelet, agent du pourridié-agaric (CAMPBELL, 1934) est également dangereux ; outre les résineux, il ravage les arbres fruitiers (GUILLAUMIN, 1977) et s'attaque à quelques plantes herbacées telle que la Pomme de terre. Le genre *Armillariella* existe de même en zone tropicale et équatoriale (GIBSON, 1975 ; MALLET et NICOLE 1984) ; son niveau d'agressivité est toutefois plus faible.

En Côte d'Ivoire, à part *Sphaerostilbe repens* responsable des chancres du collet, les agents de pourridié les plus répandus sont *Rigidoporus lignosus* (Kl.) Imazeki (ex *Fomes lignosus*) agent du pourridié blanc et *Phellinus noxius* (Corner) G.H. Cunn (ex *Fomes noxius*), agent du pourridié brun. Bien que très polyphages, ces deux Polyporaceae sont surtout connues des planteurs et des pathologistes en raison des dégâts qu'ils occasionnent aux plantations d'*Hevea brasiliensis* (Willd. Ex Adr. de Juss.) Muell Arg., Euphorbiacée exploitée en culture industrielle pour la production du caoutchouc.

Si *P. noxius* en tant que parasite de l'Hévéa a fait l'objet de peu de travaux (GEIGER et al., 1981 ; NICOLE et al., 1981 a et 1982 a ; NANDRIS et al., 1983 b) *R. lignosus*, par contre, a suscité l'intérêt de plusieurs chercheurs. BOISSON (1968 b, 1973 et 1983) entreprit une étude *in vitro* de la morphogénèse de ce champignon. Il définit ainsi l'existence, chez *R. lignosus*, de deux formes mycéliennes :

- la forme A qui, cultivée sur milieu gélosé, est intramatricielle. GEIGER (1975) a montré que cette forme, la seule infectieuse, est capable de sécréter des laccases, enzymes impliquées dans le processus infectieux du parasite.
- la forme B qui, cultivée sur milieu gélosé, est superficielle. Elle a le pouvoir de s'agréger en palmettes ou en rhizomorphes. Ces derniers, dans la nature, servent essentiellement à la propagation du champignon dans le sol. Cette forme est considérée comme non infectieuse.

Certains aspects de la relation *R. lignosus* - *H. brasiliensis* ont par la suite été étudiés. GEIGER et al., (1976) ont précisé la répartition des laccases fongiques et des peroxydases hôtes dans les pivots d'Hévéa parasités, et tenté d'expliquer leur rôle éventuel. NANDRIS et al., (1981) ont montré, sur le plan épidémiologique, le rôle déterminant d'une anoxie partielle du sol dans la transformation mycélienne de la forme B (non infectieuse) en la forme A (infectieuse) et dans la pénétration de ces filaments A dans les tissus racinaires de l'hôte.

Divers travaux ont également été réalisés en Malaisie et à Sri Lanka (ex Ceylan), importantes régions hévéicoles du sud-est asiatique. En effet, LIYANAGE (1977) et LIYANAGE et al.,

(1977) ont étudié la variabilité du pouvoir pathogène de *R. lignosus* et le comportement de plusieurs clones d'Hévéa face à une attaque de ce parasite.

Les données biochimiques acquises à ce jour au laboratoire, (GEIGER et *al.*, 1983 a et b) cernent précisément certaines phases de la pathogénèse de ces deux agents de pourridié (production d'enzymes extra-cellulaires *in vitro* et *in vivo*). D'autres étapes néanmoins, méritent d'être approfondies ; elles concernent principalement les modalités de la pénétration des champignons dans la racine, les processus de colonisation et de dégradation des tissus hôtes et les réactions de la plante à ces agressions. L'étude microscopique peut aider à appréhender ces événements. Elle a été réalisée dans une certaine mesure, par PERIES et IRUGALBANDARA (1973). Leur description du processus infectieux de *R. lignosus*, limitée à des observations en microscopie photomicroscopique, est cependant imprécise.

Compte tenu de la gravité de la maladie, de sa menace pour l'économie hévéicole et de la méconnaissance partielle de certains de ses aspects, j'ai entrepris une étude biologique, anatomo-pathologique et cytologique des pourritures des racines d'*H. brasiliensis* en Côte d'Ivoire. Cependant, devant l'impossibilité technique de réaliser ce travail sur du matériel Fignéux âgé, il a été nécessaire de procéder à des infections artificielles de jeunes plants d'Hévéa.

En collaboration avec NANDRIS du laboratoire de Phytopathologie de l'ORSTOM à Adiopodoumé, nous avons mis au point un protocole d'infection artificielle qui est décrit au chapitre premier de ce mémoire. Nantis de cette technique, des études fines en microscopie photonique et électronique des processus infectieux des deux agents de pourridié ont été réalisées ; les faits saillants en sont exposés dans le second chapitre. Enfin, le chapitre trois présente des observations microscopiques sur quelques réactions de l'Hévéa à ces agressions fongiques.

## QUELQUES RAPPELS SUR L'HEVEA ET SES PATHOGENES

### A. L'hôte : *Hevea brasiliensis* (Willd. Ex ADR. de Juss) Mull. Arg

Originaire d'Amazonie, *H. brasiliensis* appartient à la famille des Euphorbiacées, une des principales familles laticifères du règne végétal. C'est un arbre élevé, à fleurs monoïques et à feuilles glabres, et dont l'enracinement est pivotant ; le pivot peut atteindre de 3 à 5 mètres de longueur. Des racines latérales se développent au collet, formant le plateau racinaire.

D'une façon générale, la fécondation croisée est la règle. L'autofécondation, cependant, est possible à des degrés variables suivant les individus. Les 7 millions d'hectares actuellement cultivés dans le monde, proviennent d'une vingtaine de plants récoltés au Brésil il y a plus de cent ans. La multiplication et les croisements de ces 20 plants sont à l'origine de tous les clones connus, constituant chacun au plan génétique une famille illégitime. Les populations africaines d'Hévéa sont ainsi issues de graines dont on ne connaît que le géniteur femelle.

La contribution de la Côte d'Ivoire aux superficies hévéicoles du globe est faible (moins de 1 %). Les plantations, regroupées essentiellement dans la zone tropicale humide au sud du pays, sont partagées entre les exploitants industriels (SAPH et SOGB) et les plantations villageoises. La production annuelle globale s'élève à près de 20.000 tonnes de caoutchouc naturel.

Sur le marché mondial, celui-ci occupe une place importante face à ses concurrents de synthèse, surtout depuis la crise énergétique de 1973 à l'origine d'un accroissement du coût des matières premières. Avec un marché potentiel équivalent à 50 % du marché des élastomères, la position du caoutchouc naturel apparaît donc bien assurée.

### B. La pathologie de l'Hévéa

Comme toute culture monospécifique, celle d'*H. brasiliensis*, encourt les risques potentiels d'une épidémie à grande échelle. A tous les niveaux, les organes de l'Hévéa sont susceptibles d'attaques parasitaires d'origine fongique.

## 1. Les organes aériens

Les maladies du feuillage les plus répandues en Afrique et dans le sud-est asiatique sont imputables aux genres *Oidium* (heveae), *Colletotrichum* (ficus et heveae), *Helminthosporium* (heveae) et *Gleosporium* sp. . Des traitements connus limitent leur extension. En Amérique du Sud, toutefois, sévit un parasite extrêmement grave, *Microcyclus ulei* (Ascomycètes) capable de provoquer une défoliation foudroyante des arbres en plantation. Il est actuellement inconnu des autres régions hévéicoles du reste du monde.

Au niveau du tronc, les chancres du panneau de saignée, provoqués par *Phytophthora palmivora*, ainsi que la maladie des encoches sèches, dont la cause est mal connue, constituent les deux problèmes majeurs. A un degré moindre, les genres *Ceratocystis*, *Ustulina* et *Marasmius* peuvent également causer des altérations du tronc. A part la maladie des encoches sèches, des traitements permettent de limiter la gravité des autres attaques.

## 2. Le système racinaire

Les agents de pourridié sont à l'origine des atteintes les plus importantes du système racinaire de l'Hévéa. Au collet, *Sphaerostilbe repens* est responsable de la pourriture violette du bois. Les fissures qu'il engendre au niveau de "l'écorce" favorisent un écoulement du latex qui se coagule au contact de l'air. En Côte d'Ivoire, cette maladie n'entrave cependant pas la production de caoutchouc.

*Armillariella mellea*, agent du pourridié agaric, colonise également les zones corticales des racines. Jamais signalée sur *H. brasiliensis* en Côte d'Ivoire, sa présence a été rapportée au Cameroun et au Congo. Avec *Ganoderma pseudoferreum*, agent du pourridié rouge, ce sont des parasites dangereux de l'Hévéa en Afrique Centrale.

Les plus redoutables, cependant, concernent *Rigidoporus lignosus* agent du pourridié blanc et *Phellinus noxius* agent du pourridié brun, connus de longue date en Côte d'Ivoire.

## C. Diagnose des pourridiés causés par *R. lignosus* et *P. noxius*

### 1. *R. lignosus*

*R. lignosus*, se révèle sur les racines par la présence de cordons mycéliens ou rhizomorphes de couleur blanche. Ceux-ci peuvent s'anastomoser pour former un réseau dense très ramifié. La présence de carpophores à la base du tronc confirme l'attaque du système racinaire. L'apparition de symptômes foliaires (décoloration et dessèchement des feuilles) traduit, en Afrique du moins, la mort proche de l'arbre. L'examen des racines révèle alors une pourriture blanche du bois. Celle-ci, normalement sèche, évolue quelquefois en une pourriture humide par suite d'une surinfection par certains micro-organismes qui accompagnent *R. lignosus* dans les tissus. Dans le cadre d'une pourriture sèche, le bois détruit dégage une odeur agréable de champignon frais.

La propagation du parasite s'effectue soit par voie végétative, déplacement des rhizomorphes dans le sol, soit, plus rarement, par voie générative grâce aux basidiospores produites par le carpophore.

La contamination des Hévéa a lieu soit au contact de débris ligneux (souches - endains) présents dans (sur) le terrain après défriche manuelle de la forêt, soit par les rhizomorphes, qui se propagent dans le sol.

### 2. *P. noxius*

Le pourridié brun est l'une des maladies les plus largement distribuées sous les tropiques. L'agent causal, *P. noxius* est extrêmement polyphage.

Tout comme pour *R. lignosus*, aucun symptôme externe précoce sur les organes aériens ne permet de soupçonner la présence du parasite. Les racines attaquées par *P. noxius* sont recouvertes d'une croûte noirâtre, de 3 à 4 mm d'épaisseur dans laquelle sont inclus des particules terreuses et des grains de sable. Cette masse, adhérant fortement à la racine, est parcourue par des filaments mycéliens qui sécrètent un mucilage assurant la cohésion de l'ensemble.

L'observation des racines malades révèle un bois mou-  
cheté, traversé de fissures noires et brunes ; la pourriture en-  
gendrée est également blanche et sèche.

Ce parasite ne forme pas de rhizomorphes identiques à  
ceux de *R. lignosus*. Si propagation il y a, elle ne se fait que  
par voie générative. La contamination des plantes hôtes ne s'ef-  
fectue que par contact direct entre les racines et le foyer pri-  
maire. Dans les jeunes plantations, il y a donc moins de danger  
d'extension rapide de la maladie, contrairement à *R. lignosus*.

MATERIELS BIOLOGIQUES ET METHODES

## A. LES MATERIELS BIOLOGIQUES

### 1. L'hôte

Les graines d'*Hevea brasiliensis*, famille illégitime GT<sub>1</sub>, sont récoltées, fin août, dans les plantations expérimentales de l'IRCA.

Compte tenu de la faible durée du pouvoir germinatif de ces graines - 3 à 4 semaines en moyenne - une technique de conservation a été mise au point afin de pouvoir réaliser des inoculations selon besoin. Des différents essais (sous azote, sous CO<sub>2</sub>, sous vide, au froid à 4°C en atmosphère saturée en eau ou déshydratée), celui à 4°C en atmosphère saturée a donné les meilleurs résultats, à savoir plus de 60 % de germination après 5 mois de conservation.

Après la récolte, ou à l'issue de la conservation, les graines sont mises à germer en bacs de sable humide. Au bout de 15 jours, les plants sont repiqués en bacs de végétation, puis infectés à l'âge d'un mois.

### 2. Les champignons parasites

Les souches de *R. lignosus* (n°1) et *P. noxius* (n°4) isolées à partir de pivots d'*H. brasiliensis* naturellement parasités, ont été récoltées respectivement dans les plantations de l'IRCA (région d'Abidjan) et dans celle de la SOGB (Sud-Ouest de la Côte d'Ivoire). Elles sont cultivées à l'obscurité à 28°C en boîte de Pétri sur milieu malté (DIFCO) à 2 % et gélosé à 2 %.

## B. REALISATION EXPERIMENTALE DES CONFRONTATIONS HÔTE-PARASITE

Cette technique a été mise au point par NANDRIS et al. (1983 a).

### 1. *In vitro*

Deux types d'essais ont été réalisés :

a) en tube de verre : au fond de chacun des tubes ( $\emptyset = 3$  cm, L = 30 cm) sont coulés 15 ml d'un milieu malté et gélosé à 2 % ; l'ensemble est stérilisé 1 heure à 110°C. Les tubes sont ensuite

ensemencés d'un implant mycélien de 5 mm de diamètre, prélevé à la périphérie d'une culture du champignon âgé de 5 jours. Après 10 jours de colonisation du culot malté on apporte, par tube, soit 30 ml d'un milieu KNOP gélosé à 0,8 % coulé à la température de surfusion, soit un volume identique de terre stérile humide. Une graine décortiquée, ayant germé sur coton stérile, est alors déposée dans chaque tube.

b) en fiole de Roux : dans cette expérience, l'inoculum est apporté sous forme de 4 bâchettes déposées au fond de la fiole (Vol. = 500 ml). Celle-ci est alors remplie jusqu'au goulot de terre stérile humide ou de vermiculite humidifiée à l'aide d'une solution de KNOP. La graine germée est déposée dans le goulot à la surface du substrat.

Ces tubes et ces fioles sont disposés dans une enceinte climatique à la température constante de 28°C et soumis à une alternance de 12 h. d'éclairement et 12 h. d'obscurité. Le taux d'humidité relative de l'air (100 %) est obtenu et maintenu par de fréquentes brumisations d'eau. La durée de l'expérimentation est de 3 mois.

## 2. *In vivo*

Les expérimentations sont réalisées sous serre dans des bacs de végétation en béton de 1 m<sup>3</sup>. Une couche de gravier de 5 cm d'épaisseur, déposée dans le fond du bac, facilite l'écoulement de l'eau par un tuyau de drainage. Les bacs sont remplis avec de la terre prélevée dans la forêt du Banco (région d'Abidjan).

- a) Modes d'inoculation :
- l'inoculum naturel :

Il est constitué de pivots d'*H. brasiliensis* infectés naturellement en plantation. Selon le type d'expérimentation ces pivots sont :

- . soit utilisés tels quels en les enfouissant verticalement jusqu'au collet dans la terre des bacs. Les plantes sont ensuite disposées en couronne au contact du pivot.

- . soit tronçonnés en rondelles de 5 cm d'épaisseur. Après examen, seules les portions de bois bien infectées sont retenues

et disposées sous la terre, à 30 cm de profondeur en une couche homogène. Les plants sont alors repiqués dans le bac. Dans ces conditions, le poids de bois parasité apporté à chaque plant est de 500 g. environ.

- l'inoculum expérimental :

Des fragments de bois frais de branches d'Hévéa (8 cm de longueur sur 1,5 cm de diamètre) sont disposés dans des fioles de Roux de 1 litre contenant 100 ml d'eau. Chaque fiole, comprenant environ 45 bâchettes, est autoclavée 1 heure à 110°C, puis ensemencée à l'aide de 8 implants mycéliens ( $\emptyset$  5 mm) prélevés à partir d'une culture du parasite âgée de 5 jours. L'incubation est réalisée dans une chambre de culture à 28°C pendant 1 mois et demi, 5 et 11 mois pour *R. lignosus* et 3, 5 et 10 mois pour *P. noxius*. L'infection de la plante est effectuée en disposant 5 bâchettes parasitées, contre le pivot, à 20 cm de la surface du bac. Le poids de bois parasité apporté par plante est de 60 gr.

Des plantes non infectées et des plantes dont le pivot est entouré de 5 bâchettes non infectées servent de témoins à ces essais.

b) Mesures et contrôle du taux d'humidité de la terre des bacs

Les caractéristiques du dispositif expérimental sont décrites dans la figure 1. Afin d'homogénéiser pour chacun des bacs les paramètres physiques et hydrodynamiques du matériau sol, la terre est apportée en lits successifs de 20 cm d'épaisseur puis saturée en eau pendant une semaine. La mesure de l'humidité volumique du sol (HV) est réalisée sur tout le profil du bac à l'aide d'une sonde à neutrons de type Solo 20. Le taux d'humidité retenu pour l'expérience est alors obtenu, au niveau où sont situées les bâchettes-inoculum, par apports en eau modulés en

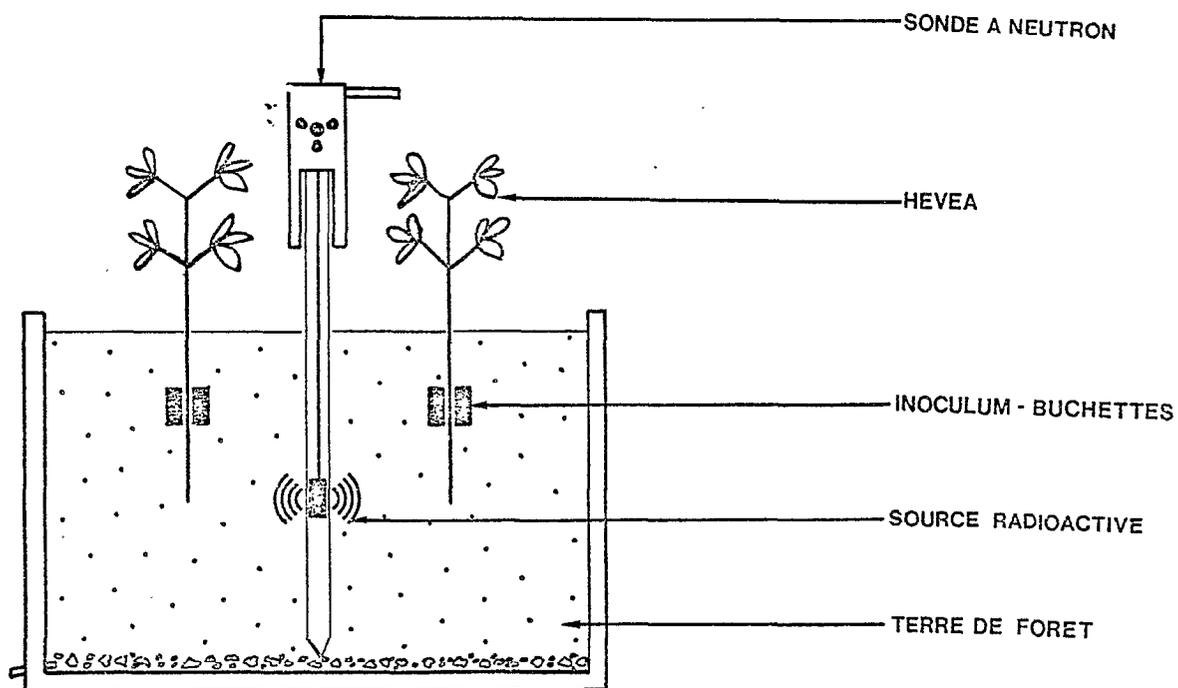


Figure 1 : Schéma du dispositif expérimental d'infections contrôlées de jeunes plants d'Hévéa à l'aide d'un inoculum bûchettes : bacs de végétation sous serre.

fonction des données de la sonde. Durant toute la durée de l'essai, la mesure et le contrôle de HV sont réalisés trois fois par semaine (figure 2).

Le préalable technique de caractérisation des paramètres hydro-pédologiques et neutroniques de la terre (COUCHAT, 1974) ainsi que ces mesures à la sonde ont été réalisées par le laboratoire des Radioisotopes du Centre ORSTOM d'Adiopodoumé.

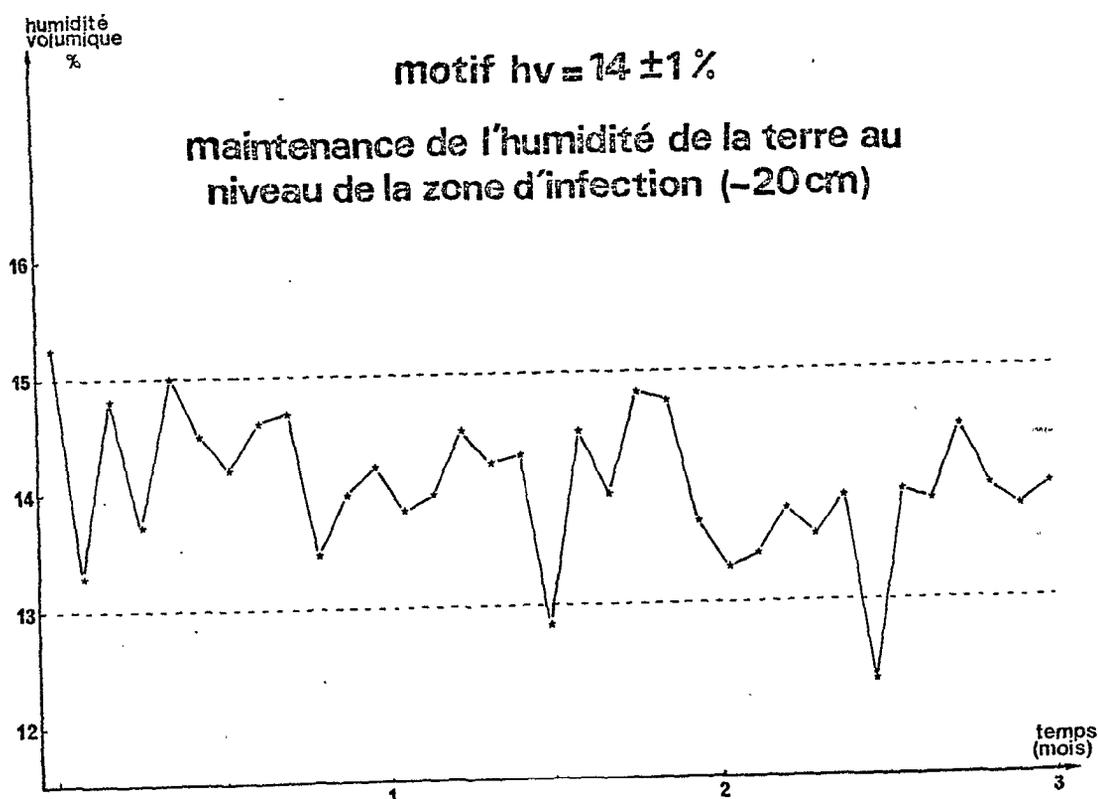


Figure 2 : Maintien, au cours du temps du niveau de l'humidité volumique (HV) de la terre d'un bac par des apports modulés en eau (Motif HV =  $14 \pm 1\%$ )

### c) Evaluation du niveau de l'attaque

Pour chaque plante, l'évaluation du niveau de l'attaque parasitaire et l'attribution de la note phytosanitaire qui en découle, résultent d'un examen macroscopique du système racinaire, d'un examen

	NOTE	APPRECIATION DE LA GRAVITE DE L'ATTAQUE
<i>RIGIDOPORUS LIGNOSUS</i>	0	Aucune trace mycélienne
	1	Filaments mycéliens non agrégés
	2	Rhizomorphes
	3	Rhizomorphes + Pénétrations ponctuelles
	4	Rhizomorphes + Nécrose localisée visible à l'oeil nu
	5	Rhizomorphes + Pourriture partielle du pivot < 20 %
	6	Rhizomorphes + Pourriture partielle du pivot de 20 à 50 %
	7	Rhizomorphes + Pourriture du pivot > 50 %
	8	Symptômes foliaires de la maladie
	9	Mort de la plante
<i>PHELLINUS NOXIUS</i>	0	Aucune trace mycélienne
	1	Début de manchon mycélien
	2	Manchon mycélien constitué
	3	Manchon + Pénétrations ponctuelles
	4	Manchon + Nécrose localisée visible à l'oeil nu
	5	Manchon + Pourriture du pivot < 20 %
	6	Manchon + Pourriture du pivot de 20 à 50 %
	7	Manchon + Pourriture importante > 50 %
	8	Symptômes foliaires de la maladie
	9	Mort de la plante

TABLEAU I : Barèmes phytosanitaires

En fonction du degré de sévérité de l'attaque, une note est affectée à chacun des plants soumis à l'examen, au terme de l'expérience.

cytologique de coupes de racines colorées au bleu coton ainsi que d'une révélation enzymatique de la laccase fongique dans les tissus de l'hôte (GEIGER et *al.* 1976). Ce dernier test, réalisé en incubant pendant 20 h. les portions de racines dans le milieu réactionnel de l'enzyme, permet en effet de révéler de façon exhaustive les pénétrations ponctuelles d'une racine, difficilement décelables au microscope.

Le barème phytosanitaire présenté dans le tableau I rend compte de l'ensemble de ces données.

### C. PREPARATION DU MATERIEL VEGETAL POUR LES OBSERVATIONS MICROSCOPIQUES

Ces observations sont réalisées aux microscopes photonique, électronique à transmission et électronique à balayage.

#### 1. La microscopie photonique (MP)

Les racines infectées sont récoltées puis fixées "*in toto*" au FAA, formol-acide acétique - alcool éthylique (50/30/90; v/v/v), de quelques heures à plusieurs jours. Après fragmentation en morceaux de 3-4 mm<sup>3</sup>, les échantillons sont déshydratés progressivement à l'alcool éthylique puis inclus dans la paraffine à 60° (Merck). Des coupes sériées, de 6 à 15 µm d'épaisseur, sont réalisées au microtome de Minot. Après déparaffinage de ces coupes, le parasite est localisé dans les tissus par la coloration au bleu de picroaniline-safranine (CARTWRIGHT, 1927) ou par celle de Pianese III B (VAUGHAN, 1914). Après avoir été montées sur lame, les coupes sont examinées au microscope Leitz Orthoplan équipé d'une chambre photographique 24 x 36 mm. Des tests histo-chimiques (tableau II) ont été pratiqués sur des coupes de matériel végétal frais, obtenues à l'aide d'un rasoir, ou des coupes de matériel végétal congelé, obtenues à l'aide d'un microtome à congélation.

#### 2. La microscopie électronique à transmission (MET)

Les techniques classiques de préparation du matériel végétal en vue de l'observation en microscopie électronique

METHODES	UTILISATIONS	REFERENCES
Rouge de Rhuthenium	Coloration des substances pectiques	JOHANSEN, 1940
Méthode de RAWLINS	Coloration des celluloses	LANGERON, 1942
Soudan III B	Coloration du liège	SHERWOOD et VANCE, 1976
Bleu d'aniline en microscopie à fluorescence	Identification de la callose	ESCHRICH et CURRIER, 1964
Test de WIESNER (phloroglucine - HCl)	Caractérisation des lignines de type coniferaldéhyde	JENSEN, 1962
Test de MAULE	Caractérisation des lignines à noyau guaïacyl	BRAUNS et BRAUNS, 1952
Chlorure ferrique	Mise en évidence des tannins	REEVE, 1959
Per chlorure de fer	Mise en évidence des phénols	SASS, 1958
Guaïacol + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Mise en évidence d'une activité peroxydasique	GEIGER et <i>al.</i> , 1976

TABLEAU II : Tests histochimiques utilisés en microscopie photonique.

(HALL, 1978) ont été modifiées pour être adaptées à l'Hévéa et ses parasites racinaires (DICKENSON, 1969).

a) Fixation

- le matériel vivant : des plantes âgées de 1 à 5 mois, et infectées par l'un des deux parasites, sont prélevées et immédiatement immergées "*in toto*", dans une solution de glutaraldéhyde utilisée à 2,5 % dans un tampon cacodylate de sodium 0,1 M, pH 7,2, pendant 4 heures. Les racines sont par la suite fragmentées dans le même fixateur en petits morceaux de 1 à 2 mm<sup>3</sup>, maintenus 2 h. dans ce fixateur puis abondamment lavés avec la solution tamponnée.

- le matériel inerte : dans le but de suivre la biodégradation du bois d'Hévéa par les deux agents de pourridié, des bûchettes d'Hévéa de 30 x 10 x 2 mm ont été façonnées à partir de pivots sains prélevés en plantation. Chaque bûchette est déposée sur billes de verre au fond d'un erlenmeyer de 200 ml contenant 25 ml d'eau distillée. L'ensemble est stérilisé 1 h. à 110°C puisensemencé d'un implant mycélien de 5 mm de diamètre prélevé à la périphérie d'une préculture gélosée de l'un des deux parasites. Tous les 8 jours pendant 1 mois, puis tous les 15 jours jusqu'à 8 mois, les bûchettes sont recueillies, nettoyées de toutes traces mycéliennes superficielles et débitées en fins copeaux de 0,1 à 0,5 mm d'épaisseur. Ceux-ci sont fixés :

- soit 2 h. dans le glutaraldéhyde tamponné, à 2,5 %
- soit 2 h. dans une solution de permanganate de potassium (KMnO<sub>4</sub>) à 2 % dans l'eau (BLAND et al., 1971 ; CZANINSKI, 1979) la déshydratation suivant immédiatement.

Après la fixation aldéhydique les fragments racinaires sont post-fixés avec le tétroxyde d'osmium en solution à 1 % dans le tampon cacodylate de sodium 0,1 M, pH 7,2. Le temps d'action est de 2 h. Cette double fixation, conseillée par HESS (1966) pour l'étude ultrastructurale de racines infectées par les champignons, ainsi que celle au KMnO<sub>4</sub>, sont effectuées à température ambiante du laboratoire (24°C).

### b) Inclusion

Après déshydratation dans les bains d'alcool éthylique de concentration croissante et passage dans deux bains d'oxyde de propylène, les échantillons sont inclus :

- soit dans l'Epon 812 selon le procédé utilisé par LUFT (1961) ;
- soit dans l'araldite selon la technique proposée par GLAUERT (1975).

Des inclusions sont également réalisées dans une résine de faible viscosité, ERL 4206, après déshydratation à l'alcool, d'après la méthode décrite par SPURR (1969).

Dans les trois cas, les temps d'imprégnation sont longs (5 à 24 h.) et ont lieu à température variant de 25 à 40°C. La polymérisation des blocs s'effectue à 60°C durant 72 h.

### c) Coupes

Elles sont réalisées avec des couteaux de verre ou de diamant, montés sur un ultramicrotome LKB. Les coupes fines sont recueillies et disposées sur des grilles sans support en cuivre de 200 mesh ou en or de 200 mesh pour la détection des polysaccharides.

### d) Contrastes

La double coloration, acétate d'uranyle - citrate de plomb, a été réalisée. L'acétate d'uranyle est employé à 5 % dans l'eau distillée, 15 min. à température ambiante et le citrate de plomb est utilisé selon la technique de REYNOLDS (1963). Pour la détection des polysaccharides, il a été fait appel à la réaction P.A.T.Ag (THIERY, 1967) dont les principales étapes sont les suivantes :

- acide periodique à 1 % dans l'eau distillée durant 30 min,
- lavage à l'eau,
- thiocarbohydrazide (TCH) à 0,2 % dans l'acide acétique à 20 % dans l'eau distillée, durant 0,5 à 5 h.,
- lavage à l'acide acétique à 10 % et 5 % puis lavage à l'eau distillée,

- protéinate d'argent à 1 % dans l'eau durant 30 min, à l'obscurité,
- lavages à l'eau distillée.

Pour les coupes témoins le bain au TCH est supprimé. Le contraste des parois cellulaires du xylème est obtenue en plongeant les coupes 30 min. dans une solution de  $KMnO_4$  à 2,5 %.

#### e) Observations

Les coupes contrastées sont observées au microscope électronique Siemens 102 du G.E.R.M.E. d'Abidjan, à 80 Kv. Les images sont photographiées sur plan-film Agfa de format 6 x 9 cm. Les tirages des clichés sont réalisés sur papier Kodak Kodabrome II RC de graduation 3 à 5.

### 3. La microscopie électronique à balayage (MEB)

Après la double fixation précédemment décrite, les échantillons sont déshydratés à l'acétone, desséchés au point critique puis métallisés à l'or. Les blocs sont ensuite examinés au microscope électronique Stereoscan 180.

Pour l'ensemble de la microscopie, des racines saines, non infectées, ont subi les mêmes traitements en guise de témoin.

## CHAPITRE I

MISE AU POINT ET DEFINITION DE PROTOCOLES EXPERIMENTAUX  
D'INFECTION EN CONDITIONS CONTRÔLEES DE JEUNES PLANTS  
D'HEVEA PAR *RIGIDOPORUS LIGNOSUS* ET *PHELLINUS NOXIUS*

La maîtrise d'une technique d'inoculation artificielle permet de reproduire le cycle infectieux d'un parasite au sein d'un hôte. Si généralement la mise au point d'une telle technique présente moins de difficultés pour les maladies foliaires (TOUZE, 1964), il n'en est pas de même en ce qui concerne les maladies racinaires d'essences ligneuses. DAY (1948) rapporte en effet, qu'il est souvent difficile d'infecter expérimentalement des arbres vivants alors que paradoxalement, au champ, les infections naturelles sont fréquentes. L'analyse bibliographique révèle que dans la grande majorité des cas, les essais d'inoculation ont été réalisés sur arbres adultes, volontairement blessés ou sains. Des portions de bois naturellement infectées (RISHBETH, 1951 ; JOHN, 1958 ; SHAIN, 1967 ; SACCAS, 1975) ou artificiellement contaminées (VARGHESE, 1967 ; KUHLMANN, 1969 ; SINGH, 1980) servent d'inoculum pour ces expérimentations.

En ce qui concerne *Hevea brasiliensis* et *Rigidoporus lignosus* des méthodes comparables ont également été proposées. Toutefois ces techniques, utilisées tant par JOHN (1958 et 1966), LYANAGE et *al.*, (1977) et PERIES et SAMARAWEERA (1963) avec un inoculum ligneux, que par DE JONG (1933) et FOX (1961) à l'aide d'une culture pure du parasite, semblent assez mal adaptées à la réalisation d'études fines de la pathogenèse en conditions contrôlées.

C'est pourquoi il est apparu nécessaire de repenser ces techniques d'inoculations à la lumière des données acquises au laboratoire (DECLERT, 1960 ; BOISSON, 1973 ; GEIGER et *al.*, 1976 ; NANDRIS et *al.*, 1981) sur la biologie du parasite. Cette expérimentation, initiée sur de jeunes plants d'Hévéa infectés avec *Rigidoporus lignosus* a été étendue à *Phellinus noxius*. Les résultats expérimentaux, présentés dans les tableaux III à V sont exprimés, selon le mode de répartition des plants par classe de note sanitaire, en % par rapport au total des plants inoculés. Le pourcentage de contamination (C) représente le nombre de plants ayant obtenu une note supérieure ou égale à 1. Le pourcentage de pénétration (P) représente le nombre de plants ayant obtenu une note supérieure ou égale à 3. La note phytosanitaire moyenne ( $\overline{NS}$ ) traduit pour chaque motif la réussite de l'infection.

I. ESSAI AVEC RIGIDOPORUS LIGNOSUSA. Inoculations in vitro (Tableau III)

TYPE D' INOCULUM	NOTE	0	1	2	3	4	5	6	7	8 D	9 M	C	P	Nb	NS
TUBE-GELOSE + TERRE	62,5	0	25	12,5	0	0	0	0	0	0	0	37,5	12,5	8	0,87
TUBE-GELOSE + KNOP	90	0	10	0	0	0	0	0	0	0	0	10	0	10	0,2
FIOLE-BUCHETTES+TERRE	10	10	70	0	10	0	0	0	0	0	0	80	10	10	1,9
FIOLE-BUCHETTES + VERMICULITE	0	10	10	30	50	0	0	0	0	0	0	100	80	10	3,2

TABEAU III : Inoculations artificielles "*in vitro*" de *Rigidoporus lignosus* sur de jeunes plants d'Hévéa :

C : contamination P : pénétration

D : dépérissement M : mortalité

Nb : Nombre de plants inoculés

NS : Note sanitaire moyenne.

Les résultats sont exprimés en % du nombre de plants inoculés (Nb).

- Au terme de l'expérience, les pourcentages de contamination et de pénétration des plants en tubes sont faibles voire nuls. De ce fait, les notes sanitaires attribuées à ces essais sont inférieures à 1.

- On observe, par contre, dans le cas de l'inoculation en fiole à l'aide de bûchettes, une prolifération du mycélium aboutissant à la contamination de 80 à 100 % des plants. Cependant, dans le meilleur des cas (sur vermiculite), la note sanitaire moyenne est de 3,2 c'est-à-dire que les plants ne présentent que des nécroses très localisées.

B. Inoculations in vivo (en serre)

## 1) Choix du type d'inoculum

Les résultats sur l'efficacité respective des deux types d'inoculum testés - naturel et expérimental - sont reportés dans le tableau IV et font apparaître les faits suivants :

La forte proportion de plants contaminés démontre dans les 3 cas, la capacité du parasite à différencier des rhizomorphes à partir du matériel infecté. Cependant, à mortalité comparable, les pourcentages de plantes pénétrées (83 %) et de plantes dépérissantes (37,5 %) sont plus élevés avec l'inoculum - bûchettes. La note  $\overline{NS}$  (5,6) reflète l'efficacité de ce mode d'inoculation qui est donc retenu pour la suite de l'expérience.

TYPE D'INOCULUM	NOTE	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	C	P	Nb	$\overline{NS}$
										D	M				
PIVOT		2	2	45	12	2	12	6	2	10	6	98	51	49	3,85
RONDELLES		9,5	8	12	20	19	9,5	3	0	9,5	9,5	90,5	70	64	3,97
BUCHETTES (11 mois)		4	0	12,5	8,5	12,5	16,5	0	0	37,5	8,5	96	83	24	5,6

TABLEAU IV : Inoculations artificielles "*in vivo*" de *Rigidoporus lignosus* sur de jeunes plants d'Hévéa :  
 C : contamination P : pénétration  
 D : dépérissement M : mortalité  
 Nb : nombre de plants inoculés  
 $\overline{NS}$  : note sanitaire moyenne

Les résultats sont exprimés en % du nombre de plants inoculés (Nb).

## 2) Incidence de l'âge de l'inoculum sur l'infection

Afin de préciser les conditions optimales de l'utilisation de cet inoculum, l'incidence de l'âge du matériel sur l'infection a été étudiée. Pour ce faire, la durée d'incubation du parasite dans les bûchettes a été modulée de 1,5 à 11 mois. On constate ainsi (figure 3) que les meilleurs résultats sont enregistrés pour des bûchettes colonisées durant onze mois avant leur utilisation.

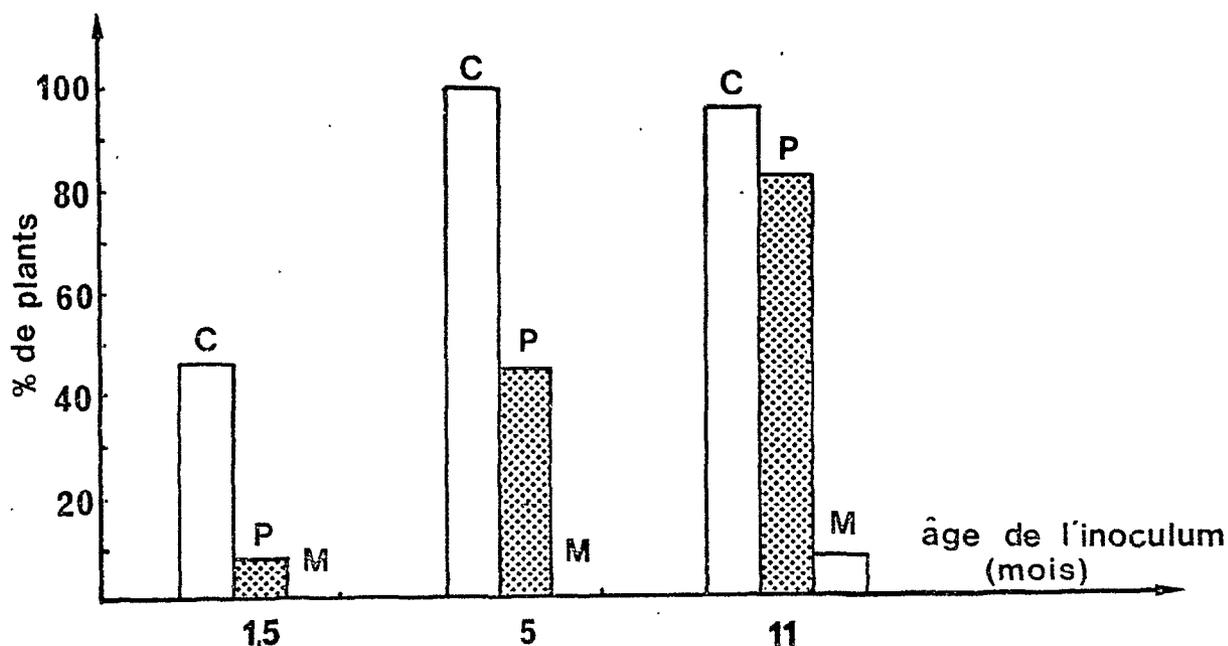


Figure 3 : Influence de l'âge de l'inoculum bûchettes (*Rigidoporus lignosus*) sur l'infection de jeunes plants d'Hévéa.

C : contamination ; P : pénétration ;  
M : plantes mortes.

Le pourcentage de plants morts obtenus au terme de cette expérience (8 %) demeure cependant peu satisfaisant. Une amélioration du rendement de la méthode a été envisagée en essayant de recréer dans les bacs d'inoculation, des conditions édaphiques se rapprochant de celles d'un milieu naturel.

### 3) Incidence de l'humidité du sol sur le pouvoir pathogène

Les travaux de BOISSON (1973) et GEIGER (1975) sur la morphogénèse et les potentialités enzymatiques de *R. lignosus* ont démontré qu'en plus de la forme rhizomorphique assurant principalement la dissémination de la maladie, existait un type mycélien particulier directement impliqué dans le processus infectieux. Plus récemment les travaux de NANDRIS et *al.*, (1981) ont mis en évidence les conditions physico-chimiques qui régissent

l'infection de l'hôte. Il a ainsi été établi qu'une anoxie partielle du sol est déterminante dans la transformation du rhizomorphe en mycélium infectieux et dans la mise en place de l'interaction hôte-parasite. Ces données ont été mises à profit pour lever le facteur limitant le rendement des inoculations. Expérimentalement des conditions d'anoxie ont été réalisées en saturant en eau la terre des bacs de végétation. Afin de mettre en évidence la relation anoxie du sol-pouvoir pathogène, un gradient d'humidité volumique de la terre a été établi sur la base des quatre motifs suivants : 10, 14, 17 et 21 %. Les valeurs 10 et 21 % correspondent aux niveaux extrêmes de l'humidité du sol, en saison sèche et en saison des pluies, dans la zone forestière de Côte d'Ivoire.

Les résultats de cette expérimentation font nettement apparaître une corrélation entre l'augmentation du taux d'humidité et la sévérité de l'attaque fongique (figure 4).

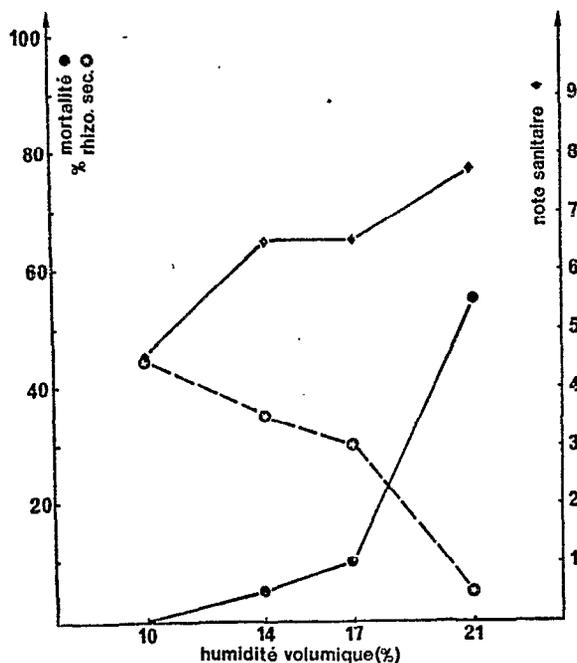


Figure 4 : Influence de l'humidité volumique du sol sur l'expression du pouvoir pathogène de *Rigidoporus lignosus* : évolution de la mortalité des plants, de la note sanitaire et mise en place d'une rhizogénèse secondaire réactionnelle (rhizo.sec.), caractérisée par une hyperélongation des racines latérales et une orthotropisation de certaines d'entre elles.

Celle-ci se caractérise dans le bac le plus humide par un taux élevé de mortalité des plants contaminés (55 %) ; en outre, les plantes restantes présentent des nécroses importantes de leur système racinaire ( $\overline{NS} > 5$ ).

En ce qui concerne l'essai réalisé à Hv = 10 %, aucun cas de mortalité n'a été enregistré, la majorité des plants ne présente qu'une pourriture partielle du pivot. Les motifs intermédiaires (Hv = 14 et 17 %) s'inscrivent entre ces deux situations extrêmes.

Par ailleurs, il faut souligner les faits suivants :

- le taux d'humidité de la terre n'a pas eu d'incidence sur la rhizomorphogénèse du parasite. De même, au vu des mesures hebdomadaires de la taille de chaque plante, aucun effet conséquent du gradient en eau sur la morphogénèse végétale n'a été noté ;

- il existe une relation inverse entre la mortalité des plantes et leur aptitude à mettre en place une rhizogénèse secondaire réactionnelle (figure 4).

A ce titre dans le bac le plus humide, le faible pourcentage de réactions des plantes est à relier avec l'existence au-dessus du plateau racinaire, de fréquentes nécroses du collet. Ce fait expliquerait la brutalité de l'attaque fongique marquée par le dépérissement de certaines plantes deux mois seulement après inoculation.

## II. ESSAI AVEC PHELLINUS NOXIUS

### A. Inoculations in vitro

Une démarche identique à celle conduite pour *R. lignosus* a été entreprise pour *P. noxius*. A l'issue des trois mois d'expérience et quel que soit le motif considéré - en tube ou en fiole - on note un échec quasi-total des inoculations. En effet, la contamination des plants n'a pratiquement pas été obtenue et de ce fait, la meilleure des notes sanitaires moyennes attribuée par essai n'est que de 0,8 pour l'essai fiole - bûchettes - vermiculite.

B. Inoculations in vivo (en serre)

## 1) Choix du type d'inoculum

L'efficacité respective d'un inoculum naturel et d'un inoculum artificiel a été étudiée. Aucune contamination n'a été observée sur les plants inoculés à l'aide de pivots. En revanche, l'essai avec des bûchettes (tableau V) est plus concluant dans la mesure où le système racinaire des plants infectés présente le manchon mycélien décrit par PICHEL (1956) comme étant caractéristique d'une attaque par *P. noxius*.

TYPE D'INOCULUM	NOTE	0	1	2	3	4	5	6	7	8 D	9 M	C	P	Nb	$\overline{NS}$
BUCHETTES (3 mois)	4,5	9	32	13,5	4,5	0	0	9	4,5	23	95,5	55	22	4,36	
BUCHETTES (5 mois)	6	14,5	0	0	11,5	17,5	17,5	6	9	18	94	79,5	34	5,26	
BUCHETTES (10 mois)	62,5	0	0	0	12,5	0	0	0	12,5	12,5	37,5	37,5	16	2,6	

TABLEAU V : Inoculations artificielles "in vivo" de *Pheellinus noxius* sur de jeunes plants d'Hévéa :  
 C : contamination      P : pénétration  
 D : dépérissement      M : mortalité  
 Nb : nombre de plants inoculés  
 $\overline{NS}$  : note sanitaire moyenne.

Les résultats sont exprimés en % du nombre de plants inoculés (Nb).

## 2) Incidence de l'âge des bûchettes sur l'infection

L'examen des notes ( $\overline{NS}$ ) affectées à chacune des trois expérimentations (tableau V) montre que la meilleure infestation des plants a été obtenue avec des bûchettes infectées depuis 5 mois. En effet dans ce cas, près de 70 % des pivots sont nécrosés. En revanche, en ce qui concerne les deux autres essais, l'attaque parasitaire ne se traduit, au mieux, que par des pénétrations ou nécroses ponctuelles.

Enfin, dans l'essai réalisé avec des bûchettes de 10 mois, 62 % des plants demeurent sains à l'issue de l'expérience.

Au vu de ces résultats, l'inoculation avec des bûchettes de 5 mois a donc été retenue pour *P. noxius*.

## DISCUSSION

Les résultats obtenus *in vitro*, tant pour *R. lignosus* que pour *P. noxius*, révèlent l'inefficacité des techniques utilisées. La fréquence des surinfections bactériennes et fongiques, la dégradation rapide de la cohésion de la gélose, et enfin le pourrissement de certaines graines sont autant de facteurs explicites, entre autres, cet échec.

Du fait des problèmes techniques rencontrés, ce type d'inoculation n'a pas été retenu. En cela, ce résultat rejoint les conclusions de DE JONG (1933) qui rapporte la difficulté d'infecter des plantes avec des cultures pures de *R. lignosus*.

En ce qui concerne les essais conduits *in vivo*, les résultats des inoculations sont plus concluants puisque la quasi-totalité des plants est infectée. Cependant en fonction des types d'inocula testés, on enregistre, à terme, des variations dans la sévérité des attaques pouvant être reliées à des différences de "qualité" de l'inoculum. Il est en effet impossible d'apprécier dans un pivot naturellement infecté, l'âge du parasite, son agressivité ainsi que le degré de colonisation du substrat ligneux. D'après KUHLMANN (1969), ces différents paramètres sont déterminants dans l'agressivité fongique et le devenir de la relation hôte-parasite.

Les résultats de cette expérience démontrent également que la réussite de l'infection n'est pas proportionnelle au poids de l'inoculum apporté par plante ; le poids des bûchettes est en effet plus de 8 fois inférieur à celui d'un pivot. Ces résultats sont, sur ce point, en désaccord avec les travaux de DE JONG (1933), ALTON (1953), JOHN (1961 et 1966) et SACCAS (1975).

Les potentialités d'infestation des bûchettes varient toutefois, selon la nature du champignon, en fonction de son âge dans le bois. Ainsi, l'optimum d'efficacité de l'inoculum correspond pour *R. lignosus* à des bûchettes de onze mois et pour *P. noxius* à des bûchettes de cinq mois :

- ceci reflète d'une part des capacités particulières de la part de chacun des parasites à dégrader le bois (NICOLE et *al.*, 1982 a). De telles différences d'agressivité ont par ailleurs été démontrées à l'issue d'une étude épidémiologique menée en

plantation (GEIGER et *al.*, 1981, NANDRIS et *al.*, 1983 b);

- cela suggère d'autre part une relation entre le degré de colonisation du bois et le déterminisme du processus infectieux. A ce titre, les travaux de SHARPLES (1936) ont établi que la différenciation des filaments mycéliens est une réaction du champignon aux conditions d'inanition existant dans un substrat dégradé.

La saturation en eau de la terre des bacs a permis d'améliorer le rendement des infections par *R. lignosus*. Ceci démontre l'influence d'une anoxie partielle du milieu sur le comportement parasitaire de ce champignon. Ce résultat, obtenu *in vivo*, conforte de précédentes recherches entreprises, *in situ* et *in vitro*, par NANDRIS et *al.*, (1981) sur la physiologie du parasitisme. Il peut être rapproché des travaux de ENGLERTH (1942) et FENTON (1943), qui ont caractérisé, en région tempérée, une sévérité particulière des attaques de conifères poussant dans des sols hydromorphes par *Fomes annosus*.

Les protocoles expérimentaux proposés pour réaliser ces infections artificielles sont certainement perfectibles et ce, tout particulièrement, en ce qui concerne *P. noxius*. En effet, à l'issue de plusieurs séries d'infections, la reproductibilité des résultats pour ce champignon d'une année sur l'autre laisse à désirer. Les variations enregistrées dans le taux de contamination des plants sont certainement à relier à l'inexistence de filaments mycéliens assurant, comme chez *R. lignosus*, une propagation rapide de la maladie. Ainsi, la pérennité du contact effectif entre le pivot et l'inoculum ne peut-elle être garantie au cours de l'expérience. A cet égard, KUHLMANN (1969) rapporte d'une manière analogue que pour *Fomes annosus*, le contact intime entre l'inoculum et l'hôte est un facteur critique dans la réussite des infections.

## CONCLUSION

Les infections artificielles de jeunes plants d'*Hevea brasiliensis* par *Rigidoporus lignosus* ou *Phellinus noxius* est réalisable avec des bûchettes de bois d'Hévéa colonisées *in vitro* par le champignon. Il est toutefois nécessaire, avant l'inoculation, de moduler l'âge du champignon dans les bûchettes en fonc-

tion des aptitudes de chaque parasite à dégrader le bois. Enfin, et tout particulièrement pour *R. lignosus*, une humidité saturante de la terre des bacs de végétation est un facteur prépondérant dans la sévérité de l'attaque parasitaire.

Sur la base des protocoles décrits, il est possible d'obtenir, dans un temps relativement court pour ce type de couple hôte-parasite, des plantes infectées aux différents stades du processus infectieux.

Cette méthodologie a été mise à profit pour réaliser une étude physiopathologique des interactions Hévéa-agents de pourridié dont l'aspect microscopique est rapporté dans les chapitres II et III.

## CHAPITRE II

ETUDE CYTOLOGIQUE COMPARATIVE DES PROCESSUS INFECTIEUX  
DE *RIGIDOPORUS LIGNOSUS* ET DE *PHELLINUS NOXIUS*

L'étude de la cinétique de l'infection de jeunes Hévéa par *R. lignosus* (NICOLE et *al.*, 1983 a) et *P. noxius* (résultats non publiés) a montré un comportement particulier de chacun des parasites au cours de la pathogénèse.

Bien que de nature apparemment identique, (NICOLE et *al.*, 1982 a), les pourritures occasionnées par *R. lignosus* et *P. noxius* résultent-elles de mécanismes d'agressions similaires ?

Telle est la question abordée dans ce chapitre. En premier lieu, j'envisage dans le détail les modalités de la pénétration, de la colonisation et de la dégradation des tissus racinaires de l'Hévéa par *R. lignosus*. Le comportement de *P. noxius* sera ensuite décrit plus succinctement.

LE PROCESSUS INFECTIEUX DE *RIGIDOPORUS LIGNOSUS*

LE PROCESSUS INFECTIEUX DE *RIGIDOPORUS LIGNOSUS*I. ULTRASTRUCTURE DES HYPHES DE *R. LIGNOSUS*A. Les composantes cellulaires d'une hyphe en activité

Les observations ont été réalisées sur l'extrémité de filaments en croissance, prélevés sur des débris ligneux, ou sur des hyphes à l'état parasite. Le cytoplasme des cellules de *R. lignosus* ne diffère pas de celui d'autres Basidiomycètes (BRACKER, 1967). On y distingue :

- 1) Le noyau (pl. I, 1) : il est délimité par une membrane nucléaire double dont les pores favorisent les relations entre le nucléoplasme et le cytoplasme. Son diamètre atteint jusqu'à 2  $\mu$ m dans sa plus grande longueur. Il n'est pas rare de constater l'existence de plusieurs noyaux par cellule (pl. I, 2).
- 2) Le réticulum endoplasmique : dans les zones étudiées, il apparaît le plus souvent associé aux ribosomes, en position périplasmique ou au voisinage du noyau (pl. I, 3).
- 3) Les mitochondries (pl. I, 4) : elles sont abondantes au voisinage de la membrane plasmique.
- 4) L'appareil de Golgi (pl. I, 5) : il est composé de vésicules de tailles diverses, regroupées mais jamais organisées en dictyosomes comme chez les Eucaryotes (BUVAT, 1969). C'est l'une des caractéristiques cytologiques des Basidiomycètes.
- 5) Les formations membranaires associées au plasmalemme : elles sont au nombre de deux :
  - les lomasomes (pl. I, 6) : très nombreux, on les rencontre généralement près de la membrane plasmique et rarement isolés dans le cytoplasme,

- les plasmalemmasomes : issue du plasmalemme (MARCHANT et al., 1973), ils existent aussi bien durant la phase saprophyte du champignon (pl. I, 7) que dans sa phase parasitaire (pl. III, 1). Ces structures sont toutefois peu fréquentes.

6) L'appareil vacuolaire : dans les zones en croissance d'hyphes saprophytiques, il est quasi-inexistant. Dans les filaments âgés ou sénescents, il occupe une part importante du volume cellulaire. Dans sa forme parasite par contre, les vacuoles sont plus nombreuses ; elles contiennent des amas circulaires très denses aux électrons (pl. II, 2).

Enfin, près du plasmalemme, le contenu de nombreuses vésicules réagit fortement au test de Thiery (pl. II, 1) ; les polysaccharides qu'elles renferment participent vraisemblablement à l'édification des parois.

7) La paroi fongique : elle sera décrite dans le paragraphe I B. Il faut cependant noter l'organisation des cloisons séparant deux articles d'une hyphe (pl. II, 3). En coupe transversale on observe une zone granuleuse en continuité avec la paroi, dont la zone centrale est plus osmiophile. De part et d'autre du pore sont disposés deux parenthèsomes, très osmiosphiles. Chacun d'eux est délimité par une double membrane non perforée. Cette structure de type dolipore-parenthèsome est, selon KAHN et KIMBROUGH (1979), fréquente chez la majorité des Basidiomycètes.

La fonction essentielle de l'appareil septal est d'assurer les échanges entre les deux cellules contigües.

#### B. Structure de la paroi de *R. lignosus* au cours des différentes phases de son cycle

Chez certaines espèces de Basidiomycètes, les hyphes s'aggrègent en cordons mycéliens (BOTTON, 1978). C'est également le cas de *R. lignosus* dont les filaments B, mis en évidence par BOISSON (1968 a) s'organisent en rhizomorphes. Cet auteur a éga-

lement défini l'existence de filaments A, responsables de l'envahissement des tissus hôtes. L'observation microscopique révèle une différence d'ordre structurale concernant la paroi de ces hyphes. En effet, l'examen comparé des filaments mycéliens de la forme saprophytique, des hyphes de la forme rhizomorphe au contact de la racine et du mycélium dans les tissus de l'hôte, met en évidence des variations importantes dans l'épaisseur de la paroi fongique (tableau VI).

Forme mycélienne Epaisseur de la paroi	HYPHES NON INFECTIEUSES - FORME B		HYPHES INFECTIEUSES - FORME A (dans les cellules de l'hôte)
	Phase saprophytique (mycélium en culture)	Phase rhizomorphe sur la racine	
0,5 à 0,7 $\mu\text{m}$		(1) très nombreuses (2) peu nombreuses	
0,2 à 0,5 $\mu\text{m}$	très nombreuses	(2) nombreuses	
0,1 à 0,2 $\mu\text{m}$		(2) nombreuses	
< 0,1 $\mu\text{m}$	très nombreuses <sup>(3)</sup>		très nombreuses

TABLEAU VI : Epaisseur de la paroi des hyphes dans chaque forme mycélienne.

- (1) au coeur du rhizomorphe
- (2) au niveau de l'interface hôte-parasite
- (3) uniquement dans les zones apicales.

Il apparaît ainsi que l'épaisseur de la paroi varie de 0,6  $\mu\text{m}$  environ au coeur du rhizomorphe (pl. II, 4, 5, 6 et 7) à 0,2  $\mu\text{m}$  environ au niveau de l'interface hôte-parasite (pl. II, 6 et 7). Les parois les plus épaisses sont composées de quatre parties :

- une couche externe (a), d'aspect granuleux, représentant en moyenne 5 % de la paroi ;
- une couche sous-jacente (b), plus homogène et plus dense aux électrons, qui représente en moyenne 8 % de la paroi ;
- une fraction médiane (c), ornée de fibres épaisses parallèles entre elles et perpendiculaires à l'axe de l'hyphe, elle constitue en moyenne 65 % de la paroi ;

- une couche interne (d), homogène et souvent imbriquée avec la précédente, qui représente 22 % de la paroi.

Les variations de l'épaisseur de la paroi, d'une hyphé à l'autre, pénalisent, en premier lieu, les fractions (b) et (c), puis les fractions (c) et (d). Cette dernière semble constituer à elle seule la paroi du mycélium infectieux (pl. III, 1) et celle de l'apex des filaments saprophytes (pl. III, 2 et 3).

## 2) Approche cytochimique de la nature des constituants pariétaux de la paroi de *R. lignosus*

L'application du test de Thiéry pour la détection des polysaccharides révèle une différence de réactivité de chacune des couches de la paroi. Les parties (b) et (d) (pl. III, 3) sont en effet les plus sensibles ; la fraction (a) ne réagit pas, alors que la couche (c) répond faiblement à ce test.

Les travaux réalisés chez d'autres Basidiomycètes par Van der VALK et *al.*, (1977), BURNETT et TRINCI (1978) sur *Schizophyllum commune* et par CHET et HUTTERMANN (1980) sur *Fomes annosus*, rapportent que 3 polymères constituent environ 70 % de la paroi de ces champignons. Ce sont :

- le  $\beta$ -D-glucane, polymère de molécules de glucose reliées entre elles par des liaisons  $\beta$  1-3 et  $\beta$  1-6 (réactivité moyenne au test de Thiéry) ;
- le  $\alpha$ -D-glucane, polymère de molécules de glucose reliées par des liaisons  $\alpha$  1-3 (réactivité quasi-nulle au test de Thiéry) ;
- la chitine, polymère de N-acetyl glucosamine (liaison  $\beta$  1-4, pas de réaction au test de Thiéry).

Sur ces bases, il apparaît que les polymères  $\beta$ -D et  $\alpha$ -D glucanes composent en grande partie la paroi de *R. lignosus*. La chitine, quelle que soit la forme mycélienne, ne constitue que 5 % environ de la paroi (NICOLE, 1982). L'analyse enzymatique et biochimique faisant défaut, il n'est pas possible d'établir les proportions de chacun des polymères. Toutefois, il semble possible de préciser :

- que la couche externe (a) est dépourvue de polysaccharides ;

- que les couches (b) et (d) sont riches en  $\beta$ -D-glucane (test de Thiéry positif) ;
- que la couche (c) contient entre autres, une proportion importante de  $\alpha$ -D-glucane et peu de  $\beta$ -D-glucane.

Enfin selon O'BRIEN et RALPH (1966), BARTNICKI-GARCIA (1968) et WESSELS et SIETSMA (1979), la chitine s'associe en général au  $\beta$ -D-glucane et se situe de préférence dans les couches les plus internes de la paroi.

### 3) Signification biologique des modifications de la paroi des hyphes au cours du cycle de *R. lignosus*

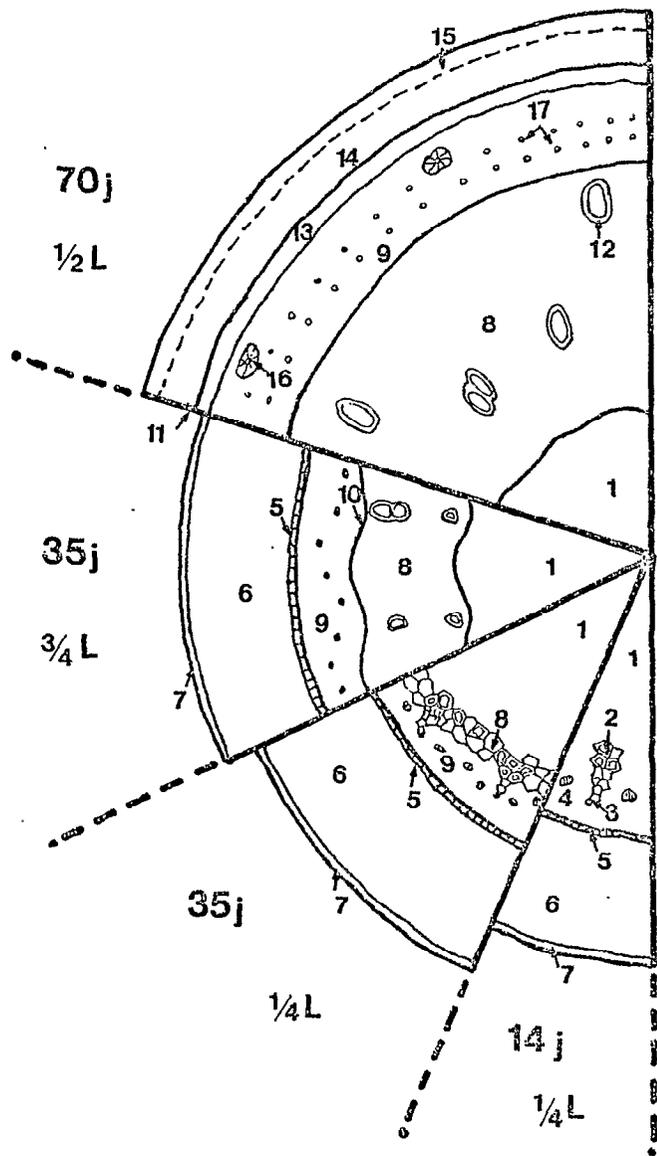
Compte tenu de la valeur constante du taux de chitine (4-5 %) de chaque forme mycélienne, les modifications structurales de la paroi, intervenant lors de la transformation des hyphes non infectieuses (forme B) en hyphes infectieuses (forme A), doivent concerner principalement les polysides  $\beta$ -D et  $\alpha$ -D glucanes. Ces changements s'accompagnent, de plus, de l'excrétion active d'enzymes extracellulaires, impliquées dans les mécanismes de dégradation des tissus hôtes (GEIGER, 1975 ; GEIGER et *al.*, 1981 ; NICOLE et *al.*, 1982 a).

Les réorientations du métabolisme glucidique, déjà évoquées par BAREYRE et BOISSON (1969) en ce qui concerne la respiration de *R. lignosus*, et du métabolisme protéique de la cellule fongique apparaissent ainsi étroitement liées à la transformation mycélienne B  $\rightarrow$  A. De ce fait, elles conditionnent vraisemblablement la pathogénicité du parasite à l'encontre de l'hôte.

## II. VOIES ET MECANISMES DE LA PENETRATION DU SYSTEME RACINAIRE DE L'HEVEA PAR *R. LIGNOSUS*

### A. Rappel de l'anatomie d'une jeune racine d'Hévéa

La figure 5 représente l'évolution schématisée de l'anatomie d'un pivot d'Hévéa pendant les 10 premières semaines après la germination de la graine. A 70 jours, les structures secondaires sont définitivement différenciées.



- 1 Parenchyme médullaire
- 2 Métaxylème
- 3 Protoxylème
- 4 Phloème primaire
- 5 Endoderme
- 6 Parenchyme cortical primaire
- 7 Assise péridermique
- 8 Xylème secondaire
- 9 Phloème secondaire
- 10 Cambium libéro ligneux
- 11 Phellogène
- 12 Vaisseaux du xylème
- 13 Phellodermé
- 14 Jeune liège
- 15 Liège âgé
- 16 Cellules scléreuses
- 17 Manteaux laticifères concentriques

Figure 5 : Anatomie d'une jeune racine saine d'*Hevea brasiliensis*  
(j : jours ; L : longueur de la racine mesurée à partir de l'apex)

Avant d'atteindre le xylème, son substrat de prédilection, le parasite devra franchir les tissus non lignifiés constitués du liège et du liber. La première étape de l'infection est la pénétration des hyphes dans la racine. Dans le cas de *R. lignosus* on distingue :

- une pénétration passive : elle s'opère par les ouvertures naturelles et les blessures non provoquées par le parasite ;
- une pénétration active : elle consiste en la perforation des structures de surface des cellules les plus externes de la racine.

#### B. La pénétration passive

Elle est favorisée par les ouvertures naturelles (lenticelles et fissures) et les blessures (zones d'abrasion). Dans les deux cas, le rhizomorphe s'y incruste intimement (pl. III, 4, 4' et 5) exerçant de ce fait une pression sur les tissus sous-jacents jusqu'à provoquer leur déchirure (pl. IV, 1). Cette action précoce, uniquement mécanique, est, à ce stade, relayée par un mécanisme plus actif.

En effet, la brèche ainsi créée multiplie les contacts entre les hyphes et les tissus corticaux (parenchyme cortical primaire pour les très jeunes racines, liège pour les plus âgées). Chaque cellule au contact des filaments perd son intégrité structurale. Les parois se ramollissent et dévoilent de nombreuses déchirures. Celles-ci peuvent survenir sans contact direct avec le champignon.

A ce stade de la pénétration, l'examen des hyphes au MET (pl. IV, 2) montre une zone granuleuse, dense aux électrons, qui précède la progression des filaments. A leur voisinage, les parois des cellules hôtes apparaissent complètement digérées, suggérant ainsi l'intervention de sécrétions capables de dégrader les composants pariétaux.

Le mécanisme ainsi décrit facilite la colonisation des couches cellulaires proches du point de pénétration, permettant à plusieurs hyphes d'occuper rapidement la lumière des cellules (pl. IV, 3).

### C. La pénétration active

En l'absence de voies naturelles, le parasite est contraint de traverser l'assise péridermique de la racine. L'opération s'effectue soit par la perforation directe des parois des cellules soit par l'insertion d'hyphes entre deux cellules de cette assise.

#### 1) La perforation des parois cellulaires

A partir d'un rhizomorphe, une ou plusieurs hyphes se développent à la surface de la racine. A un moment non déterminé, un article de ces filaments différencie une structure particulière qui traverse la paroi des cellules du périderme (pl. IV, 4). En effet, cet article, ou cellule mère, émet une ramification dont l'extrémité globuleuse est entourée, dans la cellule hôte, d'une fine pellicule granuleuse.

Au niveau de l'émergence de cette digitation, la paroi fongique subit une modification (pl. V, 1). Seule la fraction interne de la paroi participe à la différenciation, ce qui n'est pas le cas de la couche (c), la plus épaisse. Cette observation corrobore les conclusions du paragraphe I.

Au niveau de l'interface racine-rhizomorphe, une multitude de points de pénétration de ce type provoque des perturbations des parois hôtes, qui, en microscopie photonique, se traduisent par une diminution de leur fluorescence constitutive (pl. V, 2).

#### 2) L'insertion des hyphes entre deux cellules du périderme

Chez une jeune racine, âgée de 5 semaines, les parois des cellules de l'assise péridermique sont principalement constituées de cellulose. Elles sont faiblement imprégnées de liège comme le montre la coloration au Soudan III B et séparées les unes des autres par une fine pellicule de pectine. Dès l'âge de 2 mois, la coloration de la cellulose diminue ; le rouge de ruthénium ne permet plus de visualiser la pectine. Les parois réagissent par contre fortement aux colorants du liège. Quelle que soit la nature de ces parois, le parasite possède les moyens de la dégrader.

Les espaces intercellulaires de cette assise sont également des sites de pénétration dans la racine (pl. V, 3 et 4). L'examen, au microscope électronique à transmission, de coupes ultrafines réalisées à ce niveau, montre une très importante altération du ciment intercellulaire (pl. V, 5). Celui-ci perd en effet de son homogénéité en avant et au contact du parasite où il apparaît fortement digéré (pl. V, 6). Cette action drastique confère à ces parois, un aspect typique en dentelle. Il faut également signaler, dans ce cas, la différenciation de structures analogue aux haustoria (pl. V, 5).

#### D. Discussion

Deux faits saillants, marquant la pénétration des racines d'Hévéa par *R. lignosus*, méritent d'être discutés.

##### 1) Les mécanismes de la pénétration

Ils sont doubles, mécaniques et enzymatiques. La déchirure des tissus provoquée par la pression du rhizomorphe sur les cellules hôtes est la preuve d'une action mécanique. Ce résultat confirme les travaux de GARRETT (1970) et PERIES et IRULGABANDARA (1973). Ces derniers insistent par ailleurs sur la position exclusivement intercellulaire des hyphes au cours de la pénétration. Mes clichés infirment ces données et révèlent que le champignon adopte de même la position intracellulaire dès les premiers contacts avec l'hôte.

Les dégâts occasionnés aux parois des cellules péri-dermiques suggèrent l'intervention d'enzymes capables de les dégrader ; GEIGER et *al.*, (1981), ainsi que NICOLE et *al.*, (1982 a) rapportent l'existence d'hydrolases fongiques dégradant les parois des cellules hôtes. Toutefois les activités dosées sont faibles ; elles paraissent néanmoins entraîner la digestion spectaculaire de certaines régions des parois des cellules du périderme.

##### 2) La différenciation de structures spécialisées au cours de la pénétration

La description des structures présentées sur les photos 4 (pl. IV) et 5 (pl. V), n'est pas sans rappeler celle de l'haus-

torium différencié par d'autres parasites qui infectent les plantes (EHRlich et EHRlich, 1971 ; BECKETT et *al.*, 1974 ; MOURICHON et SALLE, 1981). Chez *R. lignosus*, l'haustorium est moins spécialisé que chez les Erysiphacées ou les agents de rouille, mais plus développé que les suçoirs de certaines Péronosporacées.

Selon BUSHNELL (1972) l'haustorium est défini "comme un organe spécialisé se développant dans une cellule hôte à partir d'une hyphé extracellulaire. Son rôle serait essentiellement trophique et expliquerait sa fréquence chez les parasites stricts". CALONGE (1969) avait élargi cette définition aux parasites facultatifs et aux saprophytes, comme c'est le cas pour *R. lignosus* qui existe sous les deux formes. Chez ce dernier, le déterminisme de la transformation de la forme saprophytique (forme B) en forme parasite (forme A), favorisée par une anoxie partielle du sol (NANDRIS et *al.*, 1983 a), n'est pas connu. Il est cependant possible que les exigences nutritionnelles en soient l'une des causes déterminantes, ce qui expliquerait la différenciation d'haustoria. BUSHNELL (1972), émet également l'hypothèse selon laquelle ces organes sont formés en réponse à une certaine résistance de la paroi à la pénétration. Compte tenu de l'épaisseur des parois des cellules du périderme de l'Hévéa jeune (jusqu'à 2  $\mu$ m), la différenciation d'haustoria par *R. lignosus* conforte cette idée. Leur aptitude à excréter des hydrolases (CALONGE, 1969) faciliterait ainsi la digestion des parois.

A la lumière de ces données, ces structures spécialisées différenciées par *R. lignosus* peuvent être considérées comme infectieuses. Elles jouent de ce fait un rôle non négligeable dans l'initiation de la colonisation des tissus hôtes.

### III. COLONISATION ET DEGRADATION DES TISSUS RACINAIRES NON LIGNIFIES

Les tissus racinaires non lignifiés sont formés des parenchymes (cortical et médullaire), du liège et du phloème. Chez une plante âgée de 3 semaines, le parenchyme cortical primaire est encore présent (fig. 5). A 6 semaines, il est repoussé vers l'extérieur de la racine par le jeune liège qui résulte de l'ac-

tivation du cambium subéro-phello-dermique (BOBILIOFF, 1923). A trois mois, le liège, constitué d'une dizaine de couches de cellules alignées, réagit parfaitement aux colorants marqueurs de la subérine.

Le liber contient le système cellulaire producteur de caoutchouc : les laticifères. Ceux-ci sont articulés et s'anastomosent latéralement ou par leur extrémité formant ainsi un réseau (BOBILIOFF, 1923). A l'état primaire, les laticifères peu nombreux sont noyés dans des cellules à caractère parenchymateux.

Orientés verticalement, ils sont disposés, dans le phloème secondaire, en manteaux concentriques, initiés par les cellules cambiales (pl. VI, 1, 2 et 2'). Dans le liber néoformé, les laticifères sont fonctionnels et produisent le latex ; dans le phloème âgé, les manteaux sont désorganisés par la présence de nombreuses cellules scléreuses (figure 5).

Mais ce tissu se caractérise également par sa diversité cellulaire. Parmi les éléments liberiens différenciés par le cambium libéro-ligneux, on distingue :

- les tubes criblés, cellules spécialisées dans le transfert des assimilats à partir du système foliaire ; leur fonctionnement intéresse uniquement une étroite bande de phloème (0,2 à 0,8 mm) au voisinage du cambium (HEBANT et de FAÏ, 1980). Dans le phloème âgé, les tubes criblés cessent de véhiculer la sève ;
- les cellules parenchymateuses, dont :
  - les cellules à oxalate de calcium,
  - les cellules compagnes associées aux tubes criblés,
  - les rayons libériens, en continuité avec ceux du xylème permettant le transfert de l'amidon hydrolysé, du bois aux laticifères (de FAÏ, 1981) ;
- les cellules à tannins (pl. VI, 2 et 2' ; pl. XII, 7 et 8), associées aux laticifères (TRANCARD, 1979).

L'application de colorants spécifiques des parois révèle la nature non ligneuse de l'ensemble de ces cellules (tableau VII).

COLORANT DES PAROIS	TISSU		
	Parenchyme	Liège	Phloème
Chlorure de zinc Iodure de potassium : Cellulose	+++	+(1)	+++
Rouge du ruthénium : pectine	++ (2)	0	++ (2)
Soudan III B : subérine	0	+++	0
Phloroglucine ou Permanganate de potassium : lignine	0	0	(+)(3)

TABLEAU VII : Coloration des parois cellulaires des tissus non lignifiés, (+ degré d'intensité de la coloration)

- (1) uniquement dans les jeunes cellules  
 (2) au niveau de la lamelle moyenne  
 (3) apparition, à 2 mois, d'une couche de cellules scléreuses.

Cellulose, pectine et subérine sont donc les trois constituants pariétaux que *R. lignosus* rencontre dans une jeune racine avant d'envahir le xylème. Le paragraphe suivant décrit l'aspect microscopique de leur dégradation.

#### A. Colonisation des tissus non lignifiés - dégradation des parois cellulaires

##### 1) Altération des composantes polysaccharidiques des parois

Comme précédemment rapporté, *R. lignosus* adopte dans les tissus une position intercellulaire et intracellulaire (pl. VII, 1, 1' et 2). Dans le parenchyme cortical, le passage d'une cellule à l'autre, en l'absence d'ouvertures constitutives, nécessite la perforation de la paroi. Pour ce faire, les filaments mycéliens, dans la majorité des cas, entament la dégradation par une action digestive (pl. VII, 2). Celle-ci se localise au voisinage immédiat des hyphes tant à l'apex que latéralement. Elle se traduit par une désorganisation de la lamelle

moyenne et des structures fibrillaires de la cellulose. Il est cependant fréquent d'observer une disparition quasi-totale de cette lamelle moyenne (pl. VIII, 3). Celle-ci prend au préalable un aspect alvéolaire (pl. VIII, 1) qui conduit, à terme, à la dislocation du tissu. Ce résultat est d'autant plus compréhensible que les hyphes peuvent cheminer dans la lamelle moyenne (pl. VIII, 2 et 3) ou y émettre des ramifications (pl. VIII, 4).

Ce mode de digestion des parois des cellules corticales prédomine ; il n'est pas rare cependant qu'il y soit associé un mécanisme physique. En effet, l'examen du cliché 5 de la pl. VIII montre la pression qu'exerce un filament sur les fibres cellulosiques durant sa croissance. Elle se poursuit après la perforation puisque les deux extrémités de la paroi dégradée s'invaginent dans le sens de la progression du parasite (pl. IX, 1). Il ne semble cependant pas que l'action mécanique soit seule suffisante car les zones granuleuses localisées autour de l'hyphes (pl. VIII, 5 et pl. IX, 1) suggèrent une action corrosive conjointe.

Le mécanisme de lyse des parois prévaut également dans le phloème. Il débute toutefois au niveau de la lamelle moyenne par une augmentation de l'osmiophilie de cette dernière (pl. IX, 2) qui finit par se lyser (pl. IX, 3). Cette action dégradante s'étend alors vers les fractions cellulosiques de la paroi (pl. IX, 4, 5 et 6) dont l'architecture fibrillaire est démantelée (pl. IX, 7 et 8). L'altération de ces parois conduit à des méats importants (pl. X, 1) qui favorisent également la dislocation du tissu.

## 2) Altération des parois subérifiées du liège

Leur dégradation apparaît, au MET, sous deux formes distinctes :

- dans un premier cas, elles prennent un aspect osmiophile à une certaine distance des hyphes (pl. X, 2) ou à leur contact (pl. X, 3) : Ce contraste va jusqu'à masquer l'organisation fibrillaire des parois (pl. X, 4) ;
- dans un second cas, elles sont digérées soit localement, soit totalement. Sous les points de pénétration, les cellules

du liège sont entièrement envahies (pl. X, 5). Le passage d'une cellule à l'autre (pl. X, 7) ou la progression intrapariétale des hyphes (pl. X, 6) est facilitée par une altération ponctuelle de la paroi autour des filaments (pl. X, 6) ; pl. XI, 1). Leur aspect fibreux est de ce fait profondément perturbé (pl. XI, 2). Plus rarement, des portions entières disparaissent à proximité du parasite (pl. XI, 3 et 4).

#### B. Modifications cellulaires au cours de l'infection

Le phloème est pris en exemple en raison de la diversité des cellules qui le constituent. Trois aspects des modifications au niveau cellulaire intervenant au cours de l'infection sont décrits. Ce sont :

- les altérations du cytoplasme des cellules parenchymateuses,
- les transformations du contenu des cellules à tannins,
- les perturbations au sein des laticifères.

##### 1) Les altérations du cytoplasme des cellules parenchymateuses: cas des cellules associées aux laticifères

Ces cellules, dans le phloème sain, ont un contenu cellulaire très dense (pl. XI, 5). Le noyau est volumineux, et le cytoplasme riche en organites (pl. XII, 1, 2).

Au niveau cellulaire l'infection se traduit entre autres par :

- une accumulation de précipités osmioréducteurs sur la membrane plasmique (pl. XII, 3 et 4). Celle-ci, sous l'action du champignon, se rompt ou se détache de la paroi. Dans ce cas, l'hyphe se déplace dans l'espace périplasmique (pl. XII, 4) ;
- l'apparition de composés osmiophiles dans le cytoplasme, et plus particulièrement autour des mitochondries, masquant de ce fait la membrane externe ;
- la vacuolisation du cytoplasme (pl. XII, 5) ; les organites sont alors concentrés dans une enclave cytoplasmique péri-nucléaire (pl. XII, 6).

## 2) La transformation du contenu des cellules à tannins

Dans une cellule tannifère du liber sain, le territoire cellulaire est occupé en partie par le système vacuolaire, où s'accumulent les tannins. Ceux-ci, distribués à la périphérie de la vacuole (pl. XII, 7 ; pl. VI, 2), réagissent fortement avec le tétr oxyde d'osmium (BLAND et *al.*, 1971).

Dès la pénétration du parasite dans la racine, la morphologie du contenu vacuolaire semble se modifier. Le hyaloplasme, plus dense, renferme également plus de composés osmophiles (pl. XII, 8). Au cours de l'infection, la production de tannins est telle qu'ils occupent l'ensemble de la vacuole (pl. XIII, 1).

## 3) Les perturbations au sein des laticifères

Rappelons que chez une plante saine, le latex est défini comme un protoplasme de nature colloïdale (DICKENSON, 1969) constitué :

- de particules de caoutchouc (pl. XIII, 2 et 3), polymère isoprénique, dont les plus grandes atteignent 0,5  $\mu\text{m}$  ;
- de lutoïdes, vacuoles à caractère lysosomal (PUJARNISCLE, 1969 ; RIBAILLER et *al.*, 1971 ; D'AUZAC et *al.*, 1982) entourées d'une simple membrane. Leur taille peut dépasser 2  $\mu\text{m}$ . Les lutoïdes renferment très souvent des microfibrilles de nature protéique (pl. XIII, 4 et pl. XIV, 2), (DICKENSON, 1969) ainsi que des particules de caoutchouc (HEBANT, 1981) ;
- des particules à double membrane : les particules de FREY-WISSLING, (4 à 6  $\mu\text{m}$  de diamètre) ;
- du cortège habituel d'organites cellulaires parmi lesquelles on distingue les plastes, le noyau dont les caractéristiques, également rapportées par HEBANT (1981), sont la présence de microtubules au voisinage de la membrane nucléaire (pl. XIII, 5) et l'existence de microfibrilles dans le nucléoplasme, les vacuoles "classiques" (par opposition aux lutoïdes riches en inclusions).

Il faut souligner que l'espace périplasmique des laticifères renferme fréquemment des fibres qui semblent participer à l'édification de la paroi (pl. XIII, 6).

L'ensemble des particules et des vacuoles, en suspension dans le "sérum cytoplasmique", sont chargées négativement. Elles maintiennent par leur répulsion électrostatique, la stabilité colloïdale du latex. Toute rupture de cette stabilité aboutit à la floculation puis à la coagulation du latex.

Celle-ci se produit au cours de l'infection et se déroule en plusieurs étapes (NICOLE et *al.*, 1982 b).

a) dans un premier temps, les particules de caoutchouc fusionnent et forment des microcoagula (pl. XIII, 7 et 8). L'examen attentif des clichés révèle une abondance particulière des microcoagula autour des structures vacuolaires (pl. XIV, 1) et plus particulièrement autour des lutoïdes dont la membrane est rompue en plusieurs endroits (pl. XIV, 2). C'est la phase de déstabilisation du latex. Le cytoplasme, très granuleux, renferme de nombreuses microvacuoles (pl. XV, 1) ;

b) dans un second temps, la membrane lutoïdique, ainsi que celle des particules de FREY-WISSLING (non visibles sur les figures) et des autres vacuoles, est complètement éclatée (pl. XV, 2 et 3). Les coagula augmentent de volume et sont plus compacts. Les microvacuoles fusionnent, (pl. XV, 4), favorisant l'agglomération du caoutchouc (pl. XV, 5). Cet état caractérise la coagulation ;

c) au stade ultime, tout le latex se prend en masse (pl. XV, 6). Le cytoplasme est totalement digéré ; aucune structure membranaire n'est décelable.

En aucun cas, les filaments mycéliens n'ont été observés dans les laticifères, même au début de la coagulation. Celle-ci peut même intervenir bien avant la colonisation du liber, les cellules parenchymateuses limitrophes conservant leur intégrité (pl. XV, 7).

### C. Discussion

1) La dégradation des parois apparaît comme l'une des étapes clés de la colonisation des tissus racinaires non lignifiés. L'altération des structures de surface des cellules n'est pas sélective ; elle concerne tant la cellulose que la pectine et la subérine.

Au sujet des polysaccharides, les enzymes capables d'hydrolyser la cellulose et la pectine existent chez *R. lignosus* (GEIGER et al., 1983 a). Si les activités cellulase et  $\beta$ -glucosidase ont été caractérisées dans les racines parasitées, il n'en est pas de même pour l'activité pectinolytique, uniquement dosée *in vitro* (NICOLE et al., 1982 a). Les dégâts occasionnés à la lamelle moyenne sont pourtant réels ; la dislocation des tissus le confirme. Aussi peut-on s'interroger sur les modalités de fonctionnement des enzymes pectiques de *R. lignosus*. En effet, elles sont excrétées soit en très faible quantité dans une zone réduite autour des hyphes, soit intégrées dans la paroi fongique assurant ainsi une digestion de contact. Cette dernière hypothèse est à écarter à mon sens, si l'on tient compte de la dégradation souvent importante du ciment intercellulaire (pl. IX).

Les perturbations du liège traduisent une aptitude particulière de *R. lignosus* à dégrader la subérine qui, au cours du développement des jeunes plantes, imprègne les parois. Des travaux récents (KOLATTUKUDY, 1980 et 1981), réalisés sur la pomme de terre ont montré que la subérine se compose :

- d'acides gras et d'alcools gras, caractérisés par une chaîne aliphatique de  $C_{20}$  à  $C_{30}$  ;
- de  $\omega$  hydroxy-acide gras, chaîne saturée en  $C_{18}$  ;
- d'acides dicarboxyliques, dérivés de l'oxydation des acides gras précédents ;
- de composés phénoliques parmi lesquels la vaniline et la p.hydroxybenzaldéhyde.

L'utilisation des techniques d'études des lignines a conduit KOLATTUKUDY (1981) à proposer un type d'organisation de la subérine. En effet, selon son hypothèse, une matrice phénolique, rattachée à la paroi et de structure similaire à la lignine,

servirait de support aux autres constituants.

Sur la base de ce modèle, *R. lignosus* dispose-t-il des enzymes nécessaires à la dégradation de la subérine ? Si dans les jeunes tissus (racines de 4 à 5 semaines) l'intervention d'une cellulase explique, en partie, la perforation des parois, cette enzyme paraît par contre insuffisante à justifier le même phénomène observé dans le liège de racines plus âgées (2 à 4 mois). La biodégradation des polyesters végétaux par des parasites fongiques a été démontrée en ce qui concerne la cutine (NICHOLSON et al., 1972 ; Van den ENDE et LINSKENS, 1974 ; LIN et KOLATTUKUDY, 1980 ; KOLATTUKUDY, 1981 ; DICKMAN et al., 1982 et KÖLLER et al., 1982). Elle n'a été que rarement abordée dans le cas de la subérine (KOLATTUKUDY, 1977 et 1981).

La culture de *R. lignosus* sur liège d'Hévéa a cependant permis de caractériser, dans les filtrats, la présence d'une activité estérase (GEIGER et al., 1983 a), qui, mise en évidence *in vivo*, pourrait justifier une certaine altération de la subérine. Les agents de pourridié sont toutefois plus connus pour leur production de diphénoloxydases : les laccases (GEIGER, 1975). Or, en référence au modèle proposé par KOLATTUKUDY (1981), il est possible que ces enzymes participent également à la modification du suber. Elles sont effectivement excrétées par les hyphes dès les premiers instants de leur pénétration dans les assises cellulaires subérifiées les plus externes de la racine (NICOLE et al., 1983 a). Aussi, une action conjointe cellulase-estérase-laccase est-elle envisageable au cours de la colonisation du liège. Leur implication dans le processus de dégradation de la subérine serait toutefois fonction du degré de subérification des parois.

2) En plus de la dégradation des parois, la progression du parasite dans les tissus non lignifiés favorise également des bouleversements du contenu des cellules. La vacuolisation du cytoplasme des cellules associées aux laticifères et des laticifères est caractéristique d'une dégénérescence cellulaire. Au niveau macroscopique, elle se traduit par la nécrose des tissus. Les modifications les plus remarquables s'observent cependant dans les cellules à tannins et les laticifères.

En effet, au cours de l'infection, les tannins occupent l'ensemble du système vacuolaire. Cette mobilisation d'une partie du pool phénolique constitue vraisemblablement une réponse à l'agression fongique. Chez les végétaux, les polyphénols sont effectivement connus comme intervenant dans les mécanismes de défense (SCHLOSSER, 1980) ; dans le cas de l'Hévéa, toutefois, ce n'est qu'une hypothèse qui reste à vérifier, compte tenu de l'approche succincte décrite ici.

3) Quant aux laticifères, ils sont le siège d'un phénomène très peu décrit dans la littérature : la coagulation interne du latex (de FAÏ et HEBANT, 1980). Généralement, la coagulation du latex intervient après une blessure de l'écorce, telle la saignée de l'arbre pour son exploitation. Dans ce cas, elle est conditionnée par des phénomènes purement physiques. L'étude de la coagulation au niveau de l'encoche a montré que les facteurs coagulants sont compartimentés dans les lutoïdes (SOUTHORN, 1968 ; RIBAILLER, 1972 ; HANOWER et *al.*, 1976 ; BRZOWSKA-HANOWER et *al.*, 1979). Durant l'infection, par contre, la coagulation a lieu dans les racines, sans stress physique externe. D'après les observations au MET, elle se déroule en 3 étapes.

- la phase de déstabilisation du latex ; elle se caractérise par :

- un éclatement des membranes vacuolaires (lutoïdes) qui, selon CRETIN et BANGRATZ (1983), résulte de la dégradation peroxydative des lipides membranaires consécutivement au démasquage d'activités enzymatiques génératrice d'oxygène toxique. La déstabilisation de ces membranes biologiques favorise la formation de microvésicules dont le rôle autophagique serait prépondérant.
- la formation de microcoagula, fusion des particules de caoutchouc provoquée par la libération, dans le hyaloplasme, des facteurs coagulants des lutoïdes ;

- la phase de coagulation *sensu stricto*, caractérisée par la fusion des microvacuoles et l'accumulation des coagula ;

- la prise en masse totale du caoutchouc qui marque le stade ultime du processus.

Certaines de ces étapes (rupture des membranes biologiques et vacuolisation du cytoplasme) sont identiques à celles observées par RACHMILEVITZ et FAHN (1982) au cours de la maturation des laticifères de *Ficus carica*. Ces similitudes suggèrent que le processus de coagulation interne chez l'Hévéa parasité, ne serait qu'une activation du vieillissement des laticifères.

Mais la coagulation interne du latex existe dans les tissus sains ; elle y est toutefois très faible. Elle tend à se généraliser dans les tissus infectés, dans lesquels elle apparaît néanmoins comme un phénomène secondaire de l'infection (NICOLE et al., 1982 b) tel le suggère l'absence du mycélium dans les laticifères coagulés ou en cours de coagulation. Dans ces conditions, le déterminisme de la coagulation interne ne s'explique que par une action indirecte du champignon, opérant à distance.

En effet, parmi les facteurs agissant sur la coagulation, les ions  $H^+$ , les cations divalents, les polyphénoloxydases et les protéases sont les plus actifs (HANOWER et al., 1976 ; BRZOZOWSKA-HANOWER et al., 1978). Les enzymes excrétées par les hyphes mycéliennes (NICOLE et al., 1982 a et GEIGER et al., 1983 a) et les produits de dégradation des structures cellulaires hôtes contiennent certainement l'un ou plusieurs de ces composés. Or, l'organisation fonctionnelle du phloème, interconnection des rayons libériens et des laticifères, favorise un transport radial et vertical des éléments nutritifs (HEBANT et de FAÏ, 1980), et vraisemblablement des produits de dégradation libérés dans les cellules voisines des laticifères. En outre, SHELDRAKKE et MOIR (1970) ont caractérisé dans le latex d'Hévéa non parasité, la présence d'une cellulase endogène impliquée dans la différenciation et la maturation des laticifères, et plus particulièrement dans la dégradation des parois cellulosesiques. Ce résultat est par ailleurs conforté par les travaux de GIORDANI (1980 et 1981) sur le système laticifère de *Lactuca sativa*. Une activation de cette enzyme dans les tissus (sains et contaminés) d'une racine parasitée, entraînerait une accumulation des produits de dégradation des parois dans les laticifères, favorisant ainsi le processus de coagulation interne et, partant, le vieillissement de la cellule.

Dans cette optique, la coagulation du latex sans contact direct avec le parasite est concevable. Ceci est enfin confirmé par l'absence d'écoulement du latex après une saignée des tissus sains d'un pivot parasité, 5 à 10 cm en avant des tissus nécrosés.

#### IV. COLONISATION ET DEGRADATION DES TISSUS RACINAIRES LIGNIFIES

Dans le pivot d'un jeune Hévéa âgé de 6 semaines environ, les structures secondaires sont bien différenciées (pl. XVI, 1). Le bois est dit hétéroxylé ; il se compose des éléments suivants :

- les vaisseaux, abondamment garnis de ponctuations (pl. XVI, 2),
- les rayons ligneux, dont les cellules sont en continuité avec celles des rayons du phloème,
- les fibres, également ponctuées.

La paroi d'une cellule du bois est constituée, selon WARDROP (1971), de différentes couches (tableau VIII, pl. XVI, 3 et 3') composées chacune de lignines et de polysaccharides dont le principal est la cellulose. L'application de méthodes cytochimiques permet la visualisation de ces constituants (CZANINSKI, 1979 ; CATESSON, 1980) dont les proportions varient toutefois en fonction de l'âge de l'individu et d'une espèce végétale à l'autre (SARKANEN et LUDWIG, 1971).

L'organisation cellulaire du xylème et la diversité de la composition chimique des parois conditionnent ainsi le développement d'un parasite au sein de ce tissu.

COUCHE PARIETALE		EPAISSEUR MOYENNE ( $\mu\text{m}$ ) CHEZ L'HEVEA	COMPOSITION MOYENNE THEORIQUE	REACTION AU $\text{KMnO}_4$ CHEZ L'HEVEA
Lamelle moyenne		0,3	polysaccharides acides (pectines) : 10 % lignines : 90 %	++++
Paroi primaire		0,6	fibres de cellulose sans orientation précise : 10 à 20 % lignines : 90 à 80 %	+++
Paroi secondaire	S <sub>1</sub>	2,1	fibres de cellulose et hémicellulose perpendiculaires à l'axe de la cellule : 10 % lignines : 90 %	++
	S <sub>2</sub>	12,3	fibres de cellulose et hémicellulose parallèles à l'axe de la cellule : 50 % lignines : 50 %	+
	S <sub>3</sub>	1,2	fibres de cellulose perpendiculaires à l'axe de la cellule : 90 % lignines : 10 %	~

TABLEAU VIII : Structure et composition moyenne des parois d'un vaisseau de xylème.

(d'après MONTIES et *al.*, 1980)

#### A. Le processus de colonisation du bois

Le xylème est la cible privilégiée de *R. lignosus* au cours du cycle infectieux.

*In vivo*, l'envahissement de ce tissu est indépendant du degré de colonisation des tissus corticaux. Il s'opère préférentiellement par les rayons parenchymateux (pl. XVII, 1) dans lesquels la progression des filaments est rapide. A proximité des vaisseaux, les ramifications des hyphes favorisent la pénétration de ces cellules (pl. XVI, 4). Le passage des rayons parenchymateux aux vaisseaux et aux fibres, s'effectue surtout par les ponctuations après digestion de la paroi primaire et de la lamelle moyenne. La perforation des structures de surface est par contre, moins fréquente (pl. XVII, 2), malgré l'existence de microhyphes (pl. XVII, 3) capables de s'insérer dans les couches pariétales.

*In vitro*, sur fragments stériles de racines d'Hévéa, l'envahissement du plan ligneux est anarchique. La colonisation du bois a lieu indifféremment de la nature des cellules qui le constituent. Elle s'opère soit par les pores, soit après perforation des parois (pl. XVII, 4), consécutive à la différenciation de nombreuses microhyphes.

## B. La dégradation du xylème

### 1) Les perturbations au niveau tissulaire : observation au M.P.

La coloration des lignines dans un tissu sain (tests de Maüle et de Wiesner) est rouge vineux et homogène. Dans un tissu parasité, cette coloration devient très hétérogène. Les parois des cellules attaquées par le champignon prennent, en effet, une teinte orangée qui tend à se généraliser lorsque la nécrose est totale. Examinée à la lumière ultra-violette, la fluorescence du xylème parasité est également perturbée (pl. XVII, 5), alors qu'elle apparaît homogène dans un xylème non contaminé.

Les modifications chromogènes révèlent de plus un retard de la lignification du jeune xylème néoformé ; au niveau histologique cela se traduit par une mosaïque d'îlots cellulaires plus ou moins lignifiés.

Ainsi, il apparaît que la modification des parois lignifiées soit l'une des conséquences de l'attaque du xylème par *R. lignosus*. Le paragraphe suivant analyse au niveau cellulaire, la nature, le niveau et le degré des dégâts occasionnés à ce tissu.

### 2) Aspects ultrastructuraux de la dégradation du xylème

Une comparaison est effectuée entre les aptitudes respectives de *R. lignosus* à dégrader le bois au sein d'une jeune plante d'Hévéa d'une part, et sur un substrat ligneux inerte d'autre part.

#### a) Dégradation du xylème au sein d'un jeune plant d'Hévéa

L'altération des parois cellulaires du xylème est corrélatrice à la colonisation du tissu. Elle est progressive, ordonnée et sélective, et s'opère soit ponctuellement au contact

du parasite, soit en avant des hyphes.

Chronologiquement, la dégradation des parois débute, dans la majorité des cas, au niveau de la lamelle moyenne. Deux étapes la caractérisent (pl. XVIII, 1, 1' et 2).

- la désorganisation de cette structure, démasquant une matrice légèrement granuleuse ;
- la digestion puis la perforation progressive de cette matrice, conduisant à la formation d'un méat.

Ce mécanisme a souvent lieu sans contact visible avec le parasite. Par rapport à l'axe de la cellule, l'altération évolue ensuite de manière centripète, affectant d'abord la paroi primaire (pl. XVIII, 3) puis les différentes fractions  $S_1$ ,  $S_2$  et  $S_3$  de la paroi secondaire. C'est à ce niveau précis que se manifeste une certaine sélectivité de la dégradation. En effet, la jonction des couches  $S_1/S_2$  apparaît comme une zone particulièrement sensible à l'action du champignon. L'apparition de nombreuses alvéoles (pl. XIX, 1), plus ou moins alignées et orientées perpendiculairement aux fibres constitutives de  $S_2$  (pl. XIX, 2) favorisent la séparation des deux fractions considérées. La dégradation de la couche  $S_2$  s'accroît alors parallèlement à l'alignement des fibres (pl. XIX, 3), conduisant à la disparition de plus de 50 % de cette fraction.

La couche  $S_3$ , par contre, semble le plus souvent épargnée par ce mécanisme. Elle offre toutefois moins de résistance, lorsque les parois sont perforées par les hyphes à partir de la lumière de la cellule (pl. XIX, 4). Dans ce cas, parois primaire et secondaire sont moins altérées que précédemment. La digestion ne s'effectue en effet qu'au voisinage immédiat des hyphes.

Globalement, les altérations ainsi décrites restent cependant localisées et ne s'étendent pas à tout le tissu. Sa dislocation est de ce fait limitée, même au stade ultime de l'infection de la plante. (La friabilité du bois, observée sur pivot adulte, résulte vraisemblablement de surinfections bactériennes intervenant en tant que saprophytes à la fin du cycle infectieux). Le brunissement des tissus contaminés est néanmoins généralisé, il est certainement lié à l'accumulation, dans les cellules, de produits de dégradation des parois. En effet, la lumière des

vaisseaux est progressivement obstruée par des dépôts, fins d'abord et plus denses ensuite (pl. XX, 1 et 2). Ceux-ci s'accumulent au niveau des pores et des punctuations (pl. XX, 3), bloquant les échanges cellulaires. Au MP, ces dépôts répondent aux tests des lignines. Au MET, ils prennent des aspects variés, soit massifs, osmiophiles ou non ; soit plus fins, fibrillaires ou non. Il est fréquent de constater que ces formations s'agglutinent autour des hyphes souvent dégénérescentes.

b) Dégradation du bois inerte par *R. lignosus* cultivé *in vitro* sur bûchettes d'Hévéa

Le comportement saprophytique de *R. lignosus* sur bois diffère du comportement parasitaire décrit précédemment. Quinze jours seulement après l'infestation des bûchettes, d'importantes perturbations sont visibles. L'examen attentif des coupes ultra-fines montre clairement une dégradation non ordonnée et peu sélective des parois. La prolifération de microhyphes facilite les digestions par contact (pl. XX, 4 et 6), ainsi qu'à très faible distance du mycélium (pl. XX, 7). Aucune structure pariétale n'offre apparemment de résistance particulière à la progression du champignon (pl. XX, 5). L'architecture des fibres celluloseuses des parois (pl. XX, 7) ou du complexe lignopectique de la lamelle moyenne (pl. XXI, 2) est rarement désorganisée du fait de la dissolution rapide. Dans la lumière des cellules, cependant, certains fragments des couches  $S_2$  et  $S_3$  de la paroi secondaire se détachent de la surface cellulaire et s'agglutinent autour des hyphes (pl. XXI, 1). Ces dépôts de nature fibreuse, se contrastent parfaitement au  $KMnO_4$ . Cinq à six semaines après l'infestation, la lamelle moyenne est totalement détruite, causant ainsi la perte de cohésion du tissu.

### C. Discussion

1) La colonisation préférentielle du xylème vivant par

*R. lignosus* a été évoquée par PERIES et IRUGALBANDARA (1973). Ce processus s'apparente à celui mis en oeuvre par *Fomes annosus* (PEEK et al., 1972) sur les racines d'*Epicea*, qui, à l'état jeune ne sont cependant que faiblement attaquées, contrairement à celles d'*H. brasiliensis* (NANDRIS et al., 1983 a).

La progression des hyphes jusqu'aux vaisseaux s'effectue à la faveur des ponctuations ou des perforations du bois. Celles-ci révèlent un mécanisme de pénétration active des cellules (défini par CORBETT, 1963) dont le support est la différenciation de microhyphes. Ces fines ramifications se rencontrent souvent chez les agents responsables de pourritures racinaires (CHOU et LEVI, 1971 ; PEEK et *al.*, 1972).

*In vitro* sur substrat inerte, la pénétration active des cellules est exaltée du fait de la présence de très nombreuses microhyphes. Elle coexiste avec une colonisation anarchique et rapide du plan ligneux, sans dégradation notoire du tissu. Cette phase exploratoire correspond, d'après CORBETT (1963), à la pénétration passive des éléments du bois, également déployée par *Fomes annosus* (PEEK et *al.*, 1972), *Coriolus versicolor* (DIROL, 1976) et d'autres champignons du bois (DIROL et RAVILLY, 1979 ; RADTKE et *al.*, 1981).

2) En principe, les parasites provoquant une pourriture blanche du bois, dégradent la lignine (KIRK, 1971 ; ANDER et ERIKSSON, 1978 ; ERIKSSON et *al.*, 1980) et/ou la cellulose (COWLING, 1961 ; LIESE, 1970 ; ERIKSSON, 1981).

Chez *R. lignosus*, la biodégradation du bois s'effectue tant *in vivo* qu'*in vitro*. Dans les deux cas, l'altération des parois est d'origine enzymatique, mais elle diffère par son niveau et son degré.

*In vivo*, les enzymes diffusent à distance, de la lamelle moyenne (hautement lignifiée) vers la fraction S<sub>3</sub> (faiblement lignifiée) ; les digestions par contact sont moins fréquentes. La dégradation consécutive de la lamelle moyenne et de la paroi primaire traduisent des potentialités lignolytiques réelles de la part du champignon. Les laccases entr'autres, (polyphénoloxydases excrétées par les hyphes) participent à la destruction des lignines (ANDER et ERIKSSON, 1976 ; NOGUCHI et *al.*, 1980 ; GEIGER et HUGUENIN, 1981). Ces enzymes ont d'ailleurs une forte activité dans les tissus nouvellement parasités par *R. lignosus* (GEIGER et *al.*, 1976). La sensibilité particulière de la couche S<sub>2</sub> aux enzymes fongiques s'explique, selon RUEL et *al.*, (1981),

par la faiblesse mécanique de la zone S<sub>1</sub>/S<sub>2</sub> due au changement d'orientation des fibres et par la nature, souvent mal connue, des lignines qu'elle renferme. GEIGER et *al.*, (1981) ont cependant caractérisé, chez *R. lignosus*, une cellulase et une  $\beta$ -glucosidase extracellulaires, dont les activités justifient vraisemblablement les dégâts observés à ce niveau. La résistance partielle de la fraction S<sub>3</sub> a de même été évoquée sur le Hêtre parasité par *Coriolus versicolor* (DIROL et RAVILLY, 1979) et sur l'Épicéa contaminé par *Sporotrichum pulverulentum* (RUEL et *al.*, 1981). Ces derniers l'expliquent par une porosité faible de cette couche, limitant la diffusion des enzymes ; par ailleurs, ils n'écartent pas l'hypothèse d'une présence éventuelle de composés phénoliques.

Il semblerait ainsi que les structures riches en lignines soient attaquées en premier lieu par le parasite. La digestion des polysaccharides interviendrait en second lieu, ou, au mieux, conjointement. Ce type d'altération (lamelle moyenne  $\rightarrow$  S<sub>3</sub>) n'a jamais été décrit *in vivo* chez d'autres agents de pourriture blanche. *Fomes annosus* (PEEK et *al.*, 1972) et *Fomes durissimus* (SANTRA et NANDI, 1975) opèrent en effet de la lumière de la cellule vers la lamelle moyenne.

*In vitro*, par contre, la majorité des champignons lignivores, dont *R. lignosus*, se comportent de cette dernière manière (COWLING, 1965 ; DIROL, 1976). En ce qui concerne l'Hévée, la lamelle moyenne est attaquée tardivement, après les parois secondaire et primaire. En outre, la fraction S<sub>3</sub> n'oppose pas de résistance à la décomposition enzymatique. Cette dégradation non sélective des constituants pariétaux, *in vitro*, s'explique certainement par la nature inerte du substrat. Sur racine vivante, par contre, le parasite est gêné dans son action par les réactions de la plante. Il est ainsi probable que certaines enzymes fongiques, impliquées dans le processus de dégradation du bois, s'expriment de préférence *in vitro*, justifiant, de ce fait, l'orientation de la dégradation paroi secondaire (riche en oses)  $\rightarrow$  lamelle moyenne (pauvre en oses).

3) Le produit des activités enzymatiques au sein du xylème aboutit, *in vivo* principalement, à l'accumulation dans les cellules, de produits de dégradation dont la nature ligneuse est en

partie démontrée par les tests colorimétriques spécifiques. L'origine réactionnelle de ces dépôts est envisagée, mais elle demeure difficilement vérifiable. Ils provoquent cependant, l'obturation des vaisseaux, bloquant la circulation de la sève brute et des échanges cellulaires. La plante compense néanmoins cette déficience en différenciant des racines secondaires qui favorisent ainsi sa survie (NICOLE et *al.*, 1983 a).

LE PROCESSUS INFECTIEUX DE *PHELLINUS NOXIUS*

La pourriture blanche des racines d'*Hevea brasiliensis* causée par *P. noxius* est semblable à celle provoquée par *R. lignosus* (NICOLE et al., 1982 a). Parmi les étapes qui constituent le processus infectieux de *P. noxius*, seules les suivantes seront décrites dans la seconde partie de ce chapitre :

- la pénétration du parasite dans les tissus racinaires : l'étude est réalisée au MP ; la composition du manchon mycélien (sable, terre, ...) rend très délicate cette approche. Il est en effet indispensable de débarrasser la racine de ces agrégats, auxquels sont imbriquées les lames mycéliennes, pour effectuer les coupes sériées au microtome sans endommager le couteau. Cette opération ne laisse de ce fait que peu de filaments mycéliens au contact de l'assise péridermique. Pour ces raisons, l'ultrastructure des hyphes n'a pas été abordée.
- la colonisation et la dégradation des tissus racinaires non lignifiés : étude au MP.
- la dégradation des tissus racinaires lignifiés : étude au MP et MET, *in vivo* et *in vitro*.

## I. PENETRATION ET DEGRADATION DES TISSUS RACINAIRES NON LIGNIFIES

### A. La pénétration dans les tissus racinaires

Le manchon mycélien constitué par *P. noxius* autour de la racine est maintenu cohérent par un mucilage d'origine fongique. Le contact intime qui en résulte avec l'assise péridermique, facilite la pénétration des hyphes dans les tissus corticaux (pl. XXI, 3). Les cellules du périderme, perforées par les hyphes, sont alors rapidement envahies (pl. XXI, 4). Les parois, de ce fait, sont rompues en plusieurs endroits (pl. XXI, 5). La présence du manchon le long de la racine multiplie les points de pénétration, favorisant ainsi la colonisation des tissus corticaux.

Aucune pénétration consécutive à une action mécanique n'a par contre pu être observée au MP. Enfin, les ouvertures naturelles constituent également un moyen de passage utilisé par

le champignon.

## B. La colonisation et la dégradation des tissus

### 1) Développement du mycélium dans les tissus

La première phase de la colonisation de la racine concerne les tissus corticaux secondaires. L'envahissement du liège est général et présente une caractéristique particulière relative à la morphologie du parasite. En effet, dans ce tissu, le mycélium est fin (0,5 à 1  $\mu\text{m}$ ), peu ramifié et n'a aucune affinité pour les colorants sélectifs. Par contre, dans les parenchymes ou le liber, les hyphes sont épaisses (pl. XXI, 6) et très colorées.

Les nombreuses ramifications visibles dans les cellules colonisées, conduisent dans certains cas à la formation d'amas mycéliens denses obstruant totalement la lumière des cellules. Quelle que soit la nature du tissu qu'il colonise, le champignon adopte les positions intra ou intercellulaire, le passage d'une cellule à l'autre s'effectuant par perforation des parois.

### 2) Dégradation des tissus colonisés

L'application, aux tissus parasités, des colorants spécifiques des composants des parois végétales, montre, par comparaison avec les tissus sains, d'importantes perturbations de ces parois, ainsi qu'une dégradation notoire du ciment intercellulaire. Leur modification morphologique se traduit par un aspect festonné et déchiqueté, tant dans le liège (pl. XXII, 2) que dans le parenchyme primaire (pl. XXII, 1). Dans le phloème, ces dégradations affectent également le fonctionnement des laticifères dont le contenu cellulaire est entièrement coagulé.

Sur jeunes plantes uniquement, la dégradation des tissus non lignifiés est souvent quasiment achevée avant même que le xylème ne soit contaminé.

L'intense prolifération des filaments dans ces rayons ainsi que leur ramification (pl. XXII, 4) mène le parasite au parenchyme médullaire (pl. XXII, 6) et aux vaisseaux. Le passage d'une cellule à l'autre s'effectue à la faveur des ponctuations (pl. XXIII, 2) ou des perforations des parois. Enfin, dans les faisceaux ligneux, le mycélium repose sur la fraction S<sub>3</sub> de la paroi secondaire, dont il se sert de support pour se déplacer dans la cellule, (pl. XXIII, 1).

## 2) Dégradation du xylème

Au cours de l'infection, l'application de tests spécifiques des lignines en MP, révèle une variation progressive de la coloration du xylème allant du rouge pour les tissus sains à l'orange pour les tissus dégradés. Tout comme *R. lignosus*, au stade ultime de la nécrose, les vaisseaux sont fréquemment obstrués par des dépôts dont certains répondent à ces tests. L'analyse des coupes ultrafines au MET, montre une altération de la lamelle moyenne (LM) (pl. XXIII, 3) ainsi que des perturbations des parois primaires (P<sub>I</sub>) et secondaire (P<sub>II</sub>). Contrairement à *R. lignosus*, la dégradation des structures de surface n'est pas sélective et s'opère simultanément dans le sens LM → P<sub>II</sub> et P<sub>II</sub> → LM, soit à distance des hyphes, soit à leur contact.

En ce qui concerne la LM et la P<sub>I</sub>, leur attaque débute par une augmentation de leur propriété osmiophile puis s'achève par leur perforation (pl. XXIII, 4) résultant d'une digestion enzymatique (pl. XXIII, 5). Quant à la paroi secondaire, les fractions S<sub>2</sub> et S<sub>3</sub> se distinguent par une sensibilité accrue à l'action du parasite. Elle se traduit surtout par une affinité supérieure au tétr oxyde d'osmium (pl. XXIV, 1), et, pour S<sub>3</sub> principalement, par une perte conséquente de sa rigidité intrinsèque.

Au terme de la dégradation du xylème, la dislocation des cellules favorise l'effritement du bois.

## B. Observations in vitro

Quinze jours après l'infestation des bûchettes, le mycélium prolifère à la surface du bois, mais la colonisation du plan ligneux est faible (1 à 2 couches de cellules). L'attaque

des parois débute généralement au niveau de la fraction S<sub>3</sub> de la paroi secondaire et s'étend vers la lamelle moyenne. La dégradation est cependant limitée au contact des hyphes (pl. XXIV, 3).  
A ce stade :

- la LM, la P<sub>I</sub> et la fraction S<sub>1</sub> de la P<sub>II</sub>, sont faiblement altérées ;
- les fractions S<sub>2</sub> et S<sub>3</sub> le sont par contre beaucoup plus ;
- le mycélium ne différencie que peu de microhyphes.

Six mois après l'infestation, la dégradation du xylème est généralisée. Elle résulte soit de la perforation des parois par les hyphes ou les microhyphes, soit d'une attaque au niveau des ponctuations. Dans ce dernier cas, la lamelle moyenne est totalement détruite. Les dégâts les plus importants concernent cependant les parois P<sub>I</sub> et P<sub>II</sub>, dont certaines portions ont complètement disparu (pl. XXIV, 2).

### C. Discussion

L'analyse des clichés présentés ci-dessus permet de conclure quant à l'aptitude de *P. noxius* à dégrader les parois des cellules du xylème. Non seulement les fractions riches en polysaccharides sont très fortement altérées, mais la lamelle moyenne et la paroi primaire, hautement lignifiées, subissent également des dégâts non négligeables. Ces données réfutent l'idée selon laquelle *P. noxius* provoque une pourriture brune dont l'une des caractéristiques, selon COWLING (1961), WILCOX (1968) et LIESE (1970) est de n'altérer que faiblement le squelette ligneux.

La mise en évidence d'une activité laccase extracellulaire d'origine fongique (GEIGER et al., 1981), étayée par l'observation microscopique, a de ce fait, conduit notre équipe à classer ce parasite comme agent d'une pourriture blanche. Il est en effet capable de dégrader au moins partiellement, les polymères phénylpropanes, au même titre que *P. isabellinus* (ANDER et ERIKSSON, 1978) et *P. pini* (BLANCHETTE, 1979 et 1982 a), parasites du Pin.

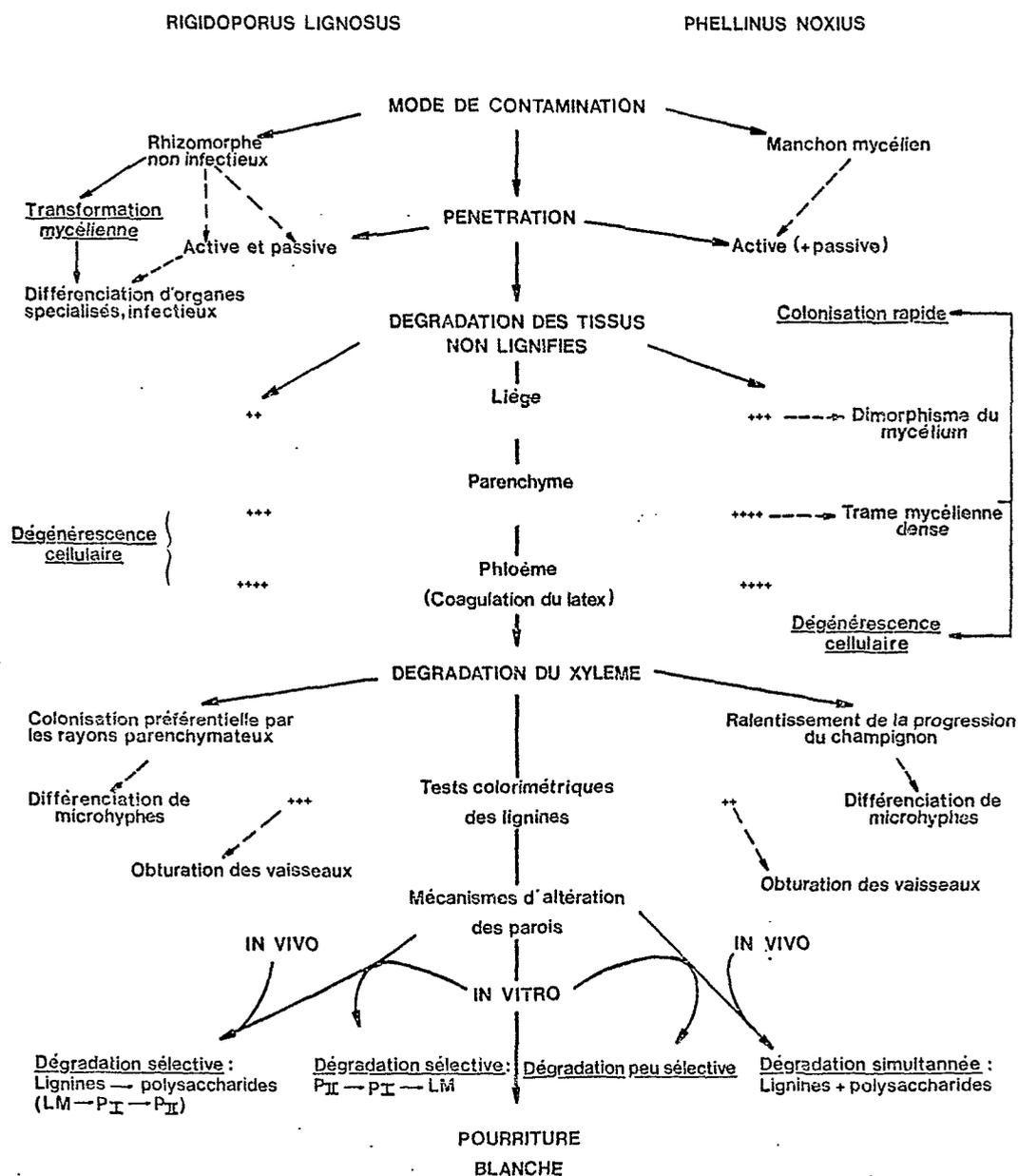
L'action digestive de *P. noxius* occasionne cependant plus de dégâts aux polysaccharides qu'aux lignines, bien qu'*in vivo* il n'y ait pas de dégradation préférentielle et qu'*in vitro*, elle soit peu sélective.

## DISCUSSION GENERALE

Dans ce chapitre, la question majeure est posée :

Les différences de comportement de *R. lignosus* et *P. noxius* à l'encontre de jeunes plantes d'*H. brasiliensis* se traduisent-elles également au niveau des mécanismes de l'agression ?

A l'issue de l'analyse microscopique précédente, il est permis d'y apporter des éléments de réponse. A cet égard, la figure ci-dessous schématise les modalités de l'infection de chacun des parasites.



## PATHOGENESE DES POURRITURES BLANCHES DES RACINES D'HEVEA BRASILIENSIS:

### L'AGRESSION DE L'HOTE PAR LES PARASITES

Deux étapes, à mon sens, présentent des caractéristiques distinctes :

- la contamination des plantes :

elle est liée à la biologie de chacun des champignons. Chez *R. lignosus*, l'aptitude des rhizomorphes à se propager dans le sol lui confère des potentialités contaminatrices élevées (NICOLE et al., 1983 a). Chez *P. noxius*, l'absence de telles structures rend indispensable un contact étroit avec l'hôte, conditionnant ainsi la réussite de l'infection (NANDRIS et al., 1983 a) ;

- la pénétration des parasites dans la racine :

elle est mixte chez *R. lignosus* (active + passive) et résulte de la transformation mycélienne (hyphe non infectieuse → hyphe infectieuse), évènement capital de la biologie du parasite (BOISSON, 1968). Les filaments infectieux ont par ailleurs la capacité de différencier des structures spécialisées analogues aux haustoria. Chez *P. noxius* par contre, la pénétration est moins complexe ; les mécanismes actifs prédominent, favorisés par l'organisation de l'interface hôte-parasite.

Dans les deux cas, le mode de contamination conditionne cette phase de la pathogénèse.

"Contamination et pénétration" apparaissent ainsi comme les étapes clefs des processus infectieux de chaque champignon. Les étapes suivantes "colonisation et dégradation des tissus racinaires" sont semblables entre elles, et ne se distinguent l'une de l'autre que par quelques variantes de leurs mécanismes. En effet, les perturbations cellulaires provoquées par *P. noxius* dans le parenchyme, le liège et le phloème prévalent par rapport à celles causées par *R. lignosus*, à l'inverse de la dégradation du xylème.

Ceci :

- d'une part, s'explique par un pool d'hydrolases plus diversifié, à activités élevées chez *P. noxius* et par des activités oxydasiques supérieures chez *R. lignosus* (GEIGER et al., 1981 et 1983 a ; NICOLE et al., 1982 a) ;

- et d'autre part, explique la colonisation rapide des tissus non lignifiés par *P. noxius*, et le ralentissement de sa progression dans le xylème.

Dans ces conditions, d'après l'observation microscopique, le bois d'Hévéa est dégradé sélectivement par *R. lignosus* (lignines puis polysaccharides) alors que ces deux constituants pariétaux sont dégradés simultanément par *P. noxius*. La pourriture blanche ainsi occasionnée par ces deux champignons résulte sans ambiguïté de l'altération des tissus racinaires consécutive à la mise en oeuvre d'enzymes dégradantes.

L'implication de celles-ci dans le processus infectieux ne suffit néanmoins pas à les considérer comme le support primaire du pouvoir pathogène. Dans ce cas :

1. Les hydrolases ont-elles un rôle exclusivement trophique comme le souligne BATEMAN et BASHAM (1978) chez les parasites facultatifs ? Ou bien certaines d'entre elles sont-elles déterminantes à l'image des pectinases des agents de pourriture molle (WOOD, 1978) ?
2. L'activité des laccases est-elle seule capable de provoquer la mort des plantes ? Leur participation à la dégradation des lignines (KIRK, 1971 ; ANDER et ERIKSSON, 1978 ; GEIGER et al., 1983 a et b ...) justifie-t-elle l'importance que l'on pourrait leur attribuer ? Quoi qu'il en soit, ces enzymes sont utilisées par notre équipe comme marqueurs de l'infection des plants d'Hévéa (GEIGER et al., 1976 ; NICOLE et al., 1982 a).
3. Dans l'hypothèse d'une réponse positive aux questions précédentes, comment expliquer que certains jeunes Hévéa moribonds montrent un pivot très partiellement nécrosé soit dans sa partie inférieure soit au niveau du plateau racinaire (NANDRIS et al., 1983 a) ? Existe-t-il une (ou plusieurs) toxine(s) produite(s) par ces parasites comme le suggère PERIES (1959) ? Il est en effet probable que certains produits de dégradation des structures cellulaires hôtes, agissant de concert avec les enzymes fongiques, aient un pouvoir phytotoxique, qui, dans certaines conditions, seraient à l'origine du dépérissement foliaire avant la nécrose totale du pivot.

- et d'autre part, explique la colonisation rapide des tissus non lignifiés par *P. noxius*, et le ralentissement de sa progression dans le xylème.

Dans ces conditions, d'après l'observation microscopique, le bois d'Hévéa est dégradé sélectivement par *R. lignosus* (lignines puis polysaccharides) alors que ces deux constituants pariétaux sont dégradés simultanément par *P. noxius*. La pourriture blanche ainsi occasionnée par ces deux champignons résulte sans ambiguïté de l'altération des tissus racinaires consécutive à la mise en oeuvre d'enzymes dégradantes.

L'implication de celles-ci dans le processus infectieux ne suffit néanmoins pas à les considérer comme le support primaire du pouvoir pathogène. Dans ce cas :

1. Les hydrolases ont-elles un rôle exclusivement trophique comme le souligne BATEMAN et BASHAM (1978) chez les parasites facultatifs ? Ou bien certains d'entre elles sont-elles déterminantes à l'image des pectinases des agents de pourriture molle (WOOD, 1978) ?
2. L'activité des laccases est-elle seule capable de provoquer la mort des plantes ? Leur participation à la dégradation des lignines (KIRK, 1971 ; ANDER et ERIKSSON, 1978 ; GEIGER et al., 1983 a et b ...) justifie-t-elle l'importance que l'on pourrait leur attribuer ? Quoi qu'il en soit, ces enzymes sont utilisées par notre équipe comme marqueurs de l'infection des plants d'Hévéa (GEIGER et al., 1976 ; NICOLE et al., 1982 a).
3. Dans l'hypothèse d'une réponse positive aux questions précédentes, comment expliquer que certains jeunes Hévéa moribonds montrent un pivot très partiellement nécrosé soit dans sa partie inférieure soit au niveau du plateau racinaire (NANDRIS et al., 1983 a) ? Existe-t-il une (ou plusieurs) toxine(s) produite(s) par ces parasites comme le suggère PERIES (1959) ? Il est en effet probable que certains produits de dégradation des structures cellulaires hôtes, agissant de concert avec les enzymes fongiques, aient un pouvoir phytotoxique, qui, dans certaines conditions, seraient à l'origine du dépérissement foliaire avant la nécrose totale du pivot.

- et d'autre part, explique la colonisation rapide des tissus non lignifiés par *P. noxius*, et le ralentissement de sa progression dans le xylème.

Dans ces conditions, d'après l'observation microscopique, le bois d'Hévéa est dégradé sélectivement par *R. lignosus* (lignines puis polysaccharides) alors que ces deux constituants pariétaux sont dégradés simultanément par *P. noxius*. La pourriture blanche ainsi occasionnée par ces deux champignons résulte sans ambiguïté de l'altération des tissus racinaires consécutive à la mise en oeuvre d'enzymes dégradantes.

L'implication de celles-ci dans le processus infectieux ne suffit néanmoins pas à les considérer comme le support primaire du pouvoir pathogène. Dans ce cas :

1. Les hydrolases ont-elles un rôle exclusivement trophique comme le souligne BATEMAN et BASHAM (1978) chez les parasites facultatifs ? Ou bien certaines d'entre elles sont-elles déterminantes à l'image des pectinases des agents de pourriture molle (WOOD, 1978) ?
2. L'activité des laccases est-elle seule capable de provoquer la mort des plantes ? Leur participation à la dégradation des lignines (KIRK, 1971 ; ANDER et ERIKSSON, 1978 ; GEIGER et *al.*, 1983 a et b ...) justifie-t-elle l'importance que l'on pourrait leur attribuer ? Quoi qu'il en soit, ces enzymes sont utilisées par notre équipe comme marqueurs de l'infection des plants d'Hévéa (GEIGER et *al.*, 1976 ; NICOLE et *al.*, 1982 a).
3. Dans l'hypothèse d'une réponse positive aux questions précédentes, comment expliquer que certains jeunes Hévéa moribonds montrent un pivot très partiellement nécrosé soit dans sa partie inférieure soit au niveau du plateau racinaire (NANDRIS et *al.*, 1983 a) ? Existe-t-il une (ou plusieurs) toxine(s) produite(s) par ces parasites comme le suggère PERIES (1959) ? Il est en effet probable que certains produits de dégradation des structures cellulaires hôtes, agissant de concert avec les enzymes fongiques, aient un pouvoir phytotoxique, qui, dans certaines conditions, serait à l'origine du dépérissement foliaire avant la nécrose totale du pivot.

Ces questions mettent en évidence la complexité de ces maladies ; les données acquises ici par l'observation microscopique apportent sans aucun doute des lumières sur l'agression de l'Hévéa par *R. lignosus* et *P. noxius*. Elles constituent une étape dans la compréhension des mécanismes de ce parasitisme.

Au plan de la pathogénèse, cependant, elles sont incomplètes car elles ne tiennent pas compte des potentialités réactionnelles de la plante. A ce titre, le chapitre suivant fait état de quelques réactions de défense caractérisées sur le plan anatomique et au niveau cellulaire.

## CHAPITRE III

ASPECTS HISTO-CYTOLOGIQUES DE QUELQUES REACTIONS DE  
DEFENSE DE L'HEVEA A L'AGRESSION PARASITAIRE

Tout organisme vivant, sujet à une attaque parasitaire, met en place des réactions dans le but d'éliminer l'agent causal responsable de l'agression. Chez les plantes, elles interviennent tant au niveau d'une population qu'au niveau de l'individu (HORSFALL et COWLING, 1980). Dans ce dernier cas, elles sont d'ordres physiques ou chimiques et peuvent être constitutives ou induites.

Parmi l'ensemble des mécanismes de défense déployés par un hôte :

- certains empêchent le développement du parasite ou conduisent à l'éradication de la maladie, la plante est résistante ;
- d'autres limitent l'extension du syndrome pathologique, la plante se trouve dans une situation d'hyposensibilité.

Dans de nombreux exemples pourtant, ces réactions sont insuffisantes et provoquent, à plus ou moins long terme, la mort de la plante comme c'est le cas, entre autres, des essences ligneuses atteintes de pourritures racinaires.

En pathologie forestière, toutefois, l'étude des réactions de défense d'un arbre s'avère délicate compte tenu :

- de la fragilité du milieu naturel en zone tropicale dans lequel évolue le couple hôte parasite (le sol),
- de la texture des tissus hôtes (les lignines),
- et de la complexité des maladies causées par ces champignons (les pourritures racinaires).

Aussi, en 1978, au cours d'un symposium intitulé "Wood Decay In Living Trees : Mechanism of Tree Defense and Wood Decay", MERRILL et SHIGO (1979) ont redéfini et précisé le concept de pourriture du bois (Wood Decay). Il apparaît ainsi, que dans le bois, l'évolution des mécanismes de dégradation intervenant durant la pathogenèse est la résultante de l'action du parasite et des réactions de défense de l'hôte, elles-mêmes fondées sur l'aptitude de la plante à reconnaître son agresseur (SHIGO et TIPPETT, 1981 a).

Au niveau biochimique et cytochimique, les études des réponses à ces attaques ont été développées par SHAIN (1967 et 1971). Sur le plan histologique par contre, les recherches sont plus récentes. SHIGO et MARX (1977) ont en effet caractérisé des phénomènes de compartimentation limitant la progression de la maladie. Ces auteurs révèlent ainsi le rôle capital des réactions anatomiques dans les mécanismes de défense des ligneux atteint de pourridié. Ce modèle de compartimentation (ou CODIT, Compartmentalization of Decay In Tree) élaboré à partir des pourritures du tronc causées par des parasites et des saprophytes, a été élargi aux pourritures des racines (TIPPETT et SHIGO, 1981). Il explique comment la plante tente de circonscire le processus de dégradation du bois non seulement dans l'espace mais aussi dans le temps, en fonction du degré de gravité de la pourriture. Le système CODIT a par ailleurs le privilège d'allier les modifications des principales voies du métabolisme aux réactions histologiques différenciées par la plante (SHORTLE, 1979).

Il est clair que ces acquisitions récentes de l'histopathologie, replacent dans un contexte nouveau les investigations en matière de défense chez les végétaux ligneux. C'est dans cette optique, que seront abordées les réactions histo-cytologiques de l'Hévéa à l'attaque des deux agents de pourridié. Chacune d'entre elles sera décrite en fonction de son apparition au cours de l'infection. Nous distinguerons ainsi :

- les réactions précoces intervenant au stade initial de la pénétration ;
- les réactions post-initiales différenciées au cours de la pénétration et de la colonisation des premières assises cellulaires ;
- les réactions intervenant durant la colonisation des tissus ;
- les réactions tardives (intervenant en tant que mécanismes ultimes), limitant l'avance fongique.

Au cours de la discussion générale, une analyse globale des résultats obtenus tentera de situer entre autres les pourridiés de l'Hévéa par rapport au système CODIT proposé par SHIGO et MARX, (1977).

## RÉSULTATS

### I. LES REACTIONS PRECOCES

Dès la contamination des plantes et les premiers stades de la pénétration par le parasite, l'Hévéa initie certaines réactions décelables au microscope. Deux exemples ont été retenus, l'un au niveau histologique, l'autre au niveau histochimique.

#### A. Hyperplasie et hypertrophie cellulaires

Cette réaction, rencontrée dans la majorité des cas sur des plantes infectées par *P. noxius* (70 %), concerne les jeunes cellules initiées par lephellogène. Dans un premier temps, se déroule un phénomène d'hyperplasie caractérisé par des cloisonnements anticlines (pl. XXIV, 4) et périclines (pl. XXIV, 5). A ce mécanisme s'associe, dans un second temps, un processus d'hypertrophie cellulaire ; plusieurs cellules, en effet, augmentent de volume (pl. XXIV, 6 et 7) et conduisent à la formation d'amas cellulaires plus ou moins organisés (pl. XXV, 2). Ceux-ci sont visibles à la loupe au faible grossissement. Le cliché 1 de la pl. XXV montre par ailleurs la pression qu'exerce les cellules hypertrophiées sur leurs voisines sous jacentes. Très souvent, ce phénomène se cristallise autour d'une ou deux cellules nécrotiques et vise à contenir les premières hyphes (pl. XXIV, 7).

#### B. Stimulation du pool phénolique

Comparativement aux tissus sains, le pool phénolique est stimulé dans les tissus infectés. Le liège, ou le parenchyme cortical primaire, sous les points de pénétration, réagissent fortement au test. Il en est de même pour les cellules à tannins dans le liber et l'ensemble du xylème. Il faut préciser que le moindre traumatisme causé par le parasite, induit une forte coloration brune naturelle, qui coïncide avec la réponse positive au test des phénols.

## II. LES REACTIONS POST-INITIALES

Elles interviennent durant la pénétration et l'envahissement des premières couches cellulaires par les parasites.

### A. Au niveau histologique

L'une des réactions les plus constantes de l'Hévée à l'attaque de *R. lignosus* et *P. noxius* est l'augmentation du nombre des assises cellulaires sous les points de pénétration. Elle résulte d'une exaltation du fonctionnement de l'assise génératrice subéro-phellodermique, soit dans le sens du liège (pl. XXV, 3), soit dans le sens du phelloderme (pl. XXV, 4). Dans les deux cas, le nombre de rangées de cellules concernées varie en moyenne de 1 à 4 et peut atteindre le rapport de 1 pour 8. Souvent, l'ensemble de ces assises évolue en "nodules" cellulaires (pl. XXV, 5) visibles à l'oeil nu, et formant des bourrelets à la surface de la racine.

### B. Au niveau cellulaire

Chez de très jeunes plantes, dans la région apicale de la racine où le cambium subéro-phellodermique est encore inactif, certaines parois cellulaires s'épaississent considérablement. C'est dans le parenchyme cortical primaire que la réaction est le plus spectaculaire (pl. XXV, 6). L'épaisseur de ces parois, quoique variable, peut atteindre en effet 3  $\mu$ m. Les dépôts observés sur ce cliché semblent s'effectuer à partir de la lumière des cellules et ne concernent que les parois orientées vers le parasite. Les essais d'identification de la nature de ces épaississements ont montré que, dans 50 % des cas, le test de la phloroglucine est positif.

Cette modification de l'architecture pariétale a également été observée dans les tissus plus âgés, au niveau des assises surnuméraires du liège. Dans ce cas précis, le test au Soudan III B est positif ; celui des lignines est par contre peu concluant.

### C. Au niveau cytochimique

Une activité peroxydasique a été recherchée par voie cytochimique. Les résultats acquis sont très positifs, mais ne permettent pas de distinguer significativement des niveaux d'activité différents. La réponse de la racine est en effet générale tant dans les tissus sains que parasités et tout au long de l'infection.

## III. LES REACTIONS INTERVENANT AU COURS DE LA COLONISATION DES TISSUS

Au cours de cette étape, les moyens mis en oeuvre par la plante pour ralentir la progression du parasite, ont surtout été observés au niveau cellulaire et principalement dans les parois. Tous les tissus racinaires sont concernés par ces réactions.

### A. Le liège

L'analyse au MP d'un jeune liège infecté par *R. lignosus* montre une modification profonde de la morphologie des parois. Certaines d'entre elles apparaissent très festonnées (pl. XXVI, 1), ce qui leur confère un aspect crénelé. L'observation, au MP à fluorescence, de ces mêmes tissus imprégnés de bleu d'aniline pour la détection de la callose, confirme cette observation. Ces structures fluorescentes (pl. XXVI, 2), dont la lumière émise est nettement supérieure à celle émise par le liège, se déposent au cours de l'infection ; les tissus sains en sont effectivement dépourvus. De plus, ces dépôts, ou papilles, semblent exclusivement localisés (ées) au contact des parois orientées vers l'intérieur de la racine.

Au MET, (pl. XXVI, 3), ces papilles sont moyennement denses aux électrons et n'ont pas une organisation fibrillaire, mais granuleuse (pl. XXVI, 4). Elles sont en outre localisées dans l'espace périplasmique entre le plasmalemme et la paroi (pl. XXVI, 4 et 5).

Un examen attentif des coupes suggère par ailleurs une induction de ces néoformations par les hyphes. Un léger bourrelet est en effet souvent visible en avant des filaments mycéliens (pl. XXVI, 6). Ce renflement peut, par la suite, s'épaissir considérablement (pl. XXVII, 1).

Ces papilles ne résistent cependant pas au parasite. Celui-ci est capable de les dégrader partiellement ou totalement (pl. XXVII, 1 et 2). Les fractions digérées prennent alors une texture irrégulière ou deviennent osmiophiles.

## B. Le phloème

L'obturation des pores des tubes criblés est la seule réaction décrite dans ce tissu. Les perforations naturelles des tubes sont effectivement obstruées par des amalgames faiblement osmiophiles (pl. XXVII, 3 et 4). L'agrandissement de l'un des deux clichés (pl. XXVII, 5), révèle une matrice généralement granuleuse qui s'anastomose avec les fibres constitutives de la paroi pré-existante. L'observation du phloème au MP à fluorescence montre que certains de ces tubes émettent une lumière verte, identique à celle émise par la callose.

## C. Le xylème

### 1) Au niveau histologique

Le cambium libéro-ligneux est à son tour le siège d'un mécanisme réactionnel.

Dans un tissu sain, il fonctionne habituellement de manière actinogène. Dans un tissu parasité par contre, cette symétrie est rompue ; l'élaboration des cellules ligneuses devient hétérogène. De petits îlots de cellules lignifiées se différencient en avant de la production cellulaire normale (pl. XXVII, 6).

Cette activation du processus de lignification n'atteint toutefois jamais l'ensemble du cambium.

## 2) Au niveau cellulaire

Deux réactions, concernant les parois, ont été remarquées :

- Les tyloses : ils ont un aspect ballonné (pl. XXVII, 7) et se forment sur la fraction S<sub>3</sub> de la paroi secondaire.
- La formation d'une nouvelle couche pariétale : au MP, de nombreux vaisseaux et fibres du xylème parasité présentent, sur les parois, des dépôts qui réagissent aux tests des lignines (pl. XXVII, 8 et pl. XXVIII, 4). Au MET, ces formations apparaissent nettement comme une couche se superposant à la paroi secondaire. Cette "paroi" est soit continue, aux contours irréguliers (pl. XXVIII, 1) soit discontinue (pl. XXVIII, 2). Sa texture granuleuse, sauf au contact de la fraction S<sub>3</sub> où l'on distingue des fibrilles (pl. XXVIII, 3), semble différente des autres parois et de la lamelle moyenne.

## IV. LES REACTIONS TARDIVES

Très rarement, certaines portions de racines infectées subissent des changements histologiques bouleversant leur organisation anatomique. L'Hévéa est en effet capable de différencier des tissus nouveaux, lignifiés ou non, que le parasite ne contamine pas. La pl. XXIX, (1 et 2) représente une coupe transversale d'une telle racine ; deux types de tissus néoformés se distinguent ainsi, les tissus à caractère méristématique et les tissus libéro-ligneux.

### A. Elaboration de foyers cellulaires à caractère méristématique

(pl. XXIX, 1 et 2)

Ces tissus prennent naissance à partir de rayons parenchymateux du xylème, (annotation 6) qui se différencient et s'agencent en amas cellulaires (annotation 5). Ceux-ci ne sont d'abord formés que de quelques cellules (pl. XXX, 1), puis évo-

luent en foyers denses (anotation 5) dont l'organisation n'est pas sans rappeler celle d'un méristème. Le centre de ces amas contient, en effet, un foyer de division cellulaire (pl. XXX, 2) autour duquel s'organise les cellules néoformées. Celles-ci ont un cytoplasme dense (pl. XXX, 3), un noyau volumineux et un rapport noyau/cytoplasme élevé, suggérant de leur part, une activité métabolique importante.

### B. Les tissus libéro-ligneux néoformés

(pl. XXIX, 1 et 2) anotation (7 et 8)

Corrélativement à la mise en place des foyers précédents, la racine différencie un néocambium libéro-ligneux reconnaissable à quelques couches de cellules aplaties et empilées, (pl. XXX, 7). Il semble s'initier à partir de l'ancien cambium (pl. XXIX, 1 et 2), et s'invagine à proximité des ébauches méristématiques (pl. XXX, 5). Il produit de part et d'autre :

1) un xylème dont les cellules, souvent contorsionnées ont d'épaisses parois abondamment garnies de ponctuations (pl. XXX, 4). Les rayons parenchymateux, en continuités avec ceux du xylème secondaire (pl. XXX, 6), sont, tout comme les amas cellulaires, fortement colorés au bleu de picroaniline, traduisant une activité métabolique certaine.

2) un liber, dans lequel sont distribuées les cellules à tannin, les laticifères ainsi que les tubes et les autres cellules.

La différenciation de ces néotissus a une conséquence directe sur le processus infectieux : le rejet vers l'extérieur des tissus natifs infectés.

## DISCUSSION

1. L'hyperplasie et l'hypertrophie cellulaires sont des réactions fréquemment rencontrées chez les végétaux (AKAI, 1959). Elles résultent d'une activation des mécanismes de croissance (multiplication et division) de structures histologiques pré-existantes. Au niveau des racines toutefois, ce type de réaction revêt un caractère particulier dans la mesure où il concerne un tissu (le liège) *a priori* peu apte à subir des modifications métaboliques si rapide. Aussi n'apparaissent-elles que dans les jeunes organes dont les parois des cellules du liège ne sont que faiblement subérifiées. La présence de quelques cellules nécrotiques au sein des amas cellulaires ainsi formés, sous entend une réaction d'hypersensibilité qui, chez certaines plantes, est un symptôme de résistance aux attaques fongiques (KIRALY, 1980). Cette hypersensibilité est peut être l'explication de l'efficacité localisée de l'hyperplasie. Celle-ci, de plus, coïncide avec une intense stimulation du pool phénolique, réaction généralisée des plantes traumatisées (KOSUGE, 1969). La présence de composés phénoliques à ce niveau, se superpose à une intense pigmentation brune naturelle de ces tissus, qui, d'après MULLICK et JENSEN (1973) aurait comme fonction de protéger les tissus vivants contre le milieu externe.

Une augmentation de la subérification de certaines parois des cellules du liège a également été décrite. Le processus de subérification chez les plantes est étroitement lié au phénomène de cicatrisation (AKAI, 1959), les dépôts de subérine s'effectuant souvent au sein des barrières corticales comme c'est le cas pour ceux induit par *R. lignosus* et *P. noxius*. Sur ce point, il y a analogie avec les barrières subérifiées mises en place par un Chêne (*Quercus robur*) pour limiter l'extension de la pourriture causée par *Stereum* sp. (PEARCE et RUTHERFORD, 1981). En fait, la subérification observée chez l'Hévéa ne semble être qu'une activation du processus se déroulant normalement dans une plante saine.

2. Les papilles néoformées dans les jeunes cellules du liège semblent être constituées de callose, comme le suggère l'observation en MP à fluorescence. Or, au MET, la callose est en principe transparente, ce qui n'apparaît pas sur les clichés. Il est ainsi vraisemblable qu'elle soit en mélange avec d'autres constituants. Les papilles induites par *Phytophthora infestans* chez *Solanum tuberosum*, par exemple, se composent de callose et de cellulose (HOHL et al., 1980). Cette hétérogénéité dans la composition des papilles, également soulignée par HEATH (1980) leur confère, de ce fait, une opacité variable aux électrons (AIST, 1976).

Le problème se pose également pour les dépôts obstruant les pores des tubes du phloème. Mais bien que leur morphologie soit identique à celle des dépôts (transparents aux électrons) rencontrés au cours de la maladie de la nécrose du phloème de l'Orme (BRAUN et SINCLAIR, 1976), ces obstructions ont de même une constitution hétérogène.

L'induction des papilles est sans aucun doute d'origine pathologique. Leur déterminisme, d'après HEATH (1980), est toutefois controversé ; certains auteurs considèrent en effet le parasite comme inducteur primaire, alors que d'autres optent pour les produits de dégradation des parois. Chez l'Hévéa, la première hypothèse paraît plausible dans la mesure où ces papilles ont toujours été observées au contact ou au voisinage de filaments fongiques.

Au niveau cellulaire également, à la production de tyloses déjà évoquée dans ce cas précis par PERIES et IRUGALBANDARA (1973), s'associe la formation d'une nouvelle couche pariétale dans les vaisseaux ou les fibres. OULETTE (1981) aborde cet aspect au MET dans la maladie hollandaise de l'Orme, causée par *Ceratocystis ulmi*. Il précise que cette fraction peut se substituer à la fraction S<sub>3</sub>, et indique en outre l'aspect stratifié de cette couche dont il pressent la nature ligneuse. Il semble ainsi y avoir concordance entre les modifications de certaines parois du xylème de l'Hévéa et celles décrites chez l'Orme. Toutefois, en ce qui concerne l'Hévéa, les données acquises à ce titre, n'autorisent pour le moment aucune interprétation du phénomène. Malgré la texture différente de celle des parois, la nature ligneuse de

cette couche peut néanmoins être avancée.

La stimulation du processus de lignification tant au voisinage du cambium libéro-ligneux qu'au cours de la pénétration dans les tissus corticaux, a certainement la même signification. Quoique beaucoup plus généralisée que dans le parenchyme cortical, elle n'affecte cependant pas l'évolution de la pourriture. Il serait néanmoins intéressant de connaître la composition de ces lignines réactionnelles, car, comme le rapportent VANCE et *al.*, (1980), il est probable qu'elle diffère de celle des lignines natives. Ce mécanisme se rencontre généralement chez les plantes et son rôle dans la résistance a largement été discuté (TOUZE et ROSSIGNOL, 1977 ; RIDE, 1978 ; HAMMERSCHMIDT et KUC, 1982). RIDE (1975), entre autres, fait état de la rapidité de synthèse des lignines en réponse à une agression fongique. A une échelle différente, la lignification observée dans le parenchyme racinaire de l'Hévéa est également prompte. A cet égard, il est possible que l'activité peroxydasique, décrite ci-dessus et rapportée par GEIGER et GOUJON (1977) et GEIGER et HUGUENIN (1981), soit impliquée dans cette biosynthèse.

3. Sur le plan de l'histogénèse, la stimulation du cambium subéro-phellodermique est systématique quelles que soient les plantes examinées. Elle n'est cependant pas spécifique puisque c'est une réponse classique à une blessure de l'écorce (AKAI, 1959 ; AKAI et FUKUTOMI, 1980 ; TIPPETT et *al.*, 1982) , et à d'autres attaques fongiques (SAKURAI, 1952 ; BIGGS et *al.*, 1983). Les résultats ne permettent toutefois pas d'établir une relation entre le nombre d'assises cellulaires néoformées et l'importance de la pénétration. Mais le parasite semble éprouver des difficultés à franchir cette barrière, quel que soit le volume cellulaire considéré. La présence d'une activité peroxydasique et la stimulation du pool phénolique sous les points de pénétration pourraient expliquer cette observation.

Les tissus réactionnels différenciés par un nouveau cambium libéro-ligneux conduisent, sur Hévéa âgé, à la formation d'un cal cicatriciel ligneux (NICOLE et *al.*, 1981 a). Seuls les individus présentant des capacités physiologiques supérieures,

pourraient atteindre ce degré ultime des mécanismes de défense. Pour les autres, la mobilisation du système défensif au détriment du métabolisme basal épuise considérablement les plantes, favorisant, à moyen terme, leur vulnérabilité. Aussi, la possibilité de disposer de réserves énergétiques suffisantes constitue, selon McLAUGHLIN et SHRINER (1980), un atout sérieux pour la survie de la plante. C'est dans cette optique que SHARPPLES et GUNNERY (1933), décrivant sur Hévéa le même type d'histogénèse, insistent sur le rôle trophique de ces néoformations et sur leur importance dans la reprise de croissance de l'arbre.

Les travaux récents sur les réactions anatomiques des ligneux révèlent que l'élaboration de ces barrières à partir du xylème, favorise la compartimentation de la pourriture (SHIGO et MARX, 1977). Celles causées par *Fomes annosus* (SHIGO, 1975 ; TIPPET et SHIGO, 1980) et *Armillaria mellea* (SHIGO et TIPPET, 1981 a ; TIPPET et SHIGO, 1981) subissent des contraintes identiques, au même titre que pour l'Orme parasité par *Ceratocystis ulmi* (SHIGO et TIPPET, 1981 b ; SHIGO, 1982 a).

D'après l'analyse bibliographique, la différenciation de barrières anatomiques résulte sans ambiguïté, de l'action conjointe des rayons du bois et du cambium (PEARCE, 1982 et SHIGO, 1982 b). Toutefois l'initiation du néocambium, selon BLANCHETTE (1982 a et b) semble étroitement liée à la destruction partielle du cambium natif; la mort d'une fraction des cellules cambiales serait, dans ce cas, considérée comme élément inducteur.

#### 4. Rôle des réactions histologiques dans la pathogénèse : le modèle C.O.D.I.T.

Les réactions intervenant au cours de la pénétration sont les plus diversifiées. C'est à ce stade, d'ailleurs, que se manifeste souvent la résistance de l'hôte (SHERWOOD et VANCE, 1980). Les assises surnuméraires corticales et les nodules cellulaires ralentissent localement la progression des hyphes. Ce n'est pas le cas des renforcements des parois, qu'ils soient lignifiés ou subérifiés ; les parasites possèdent en effet les enzymes dégradantes correspondantes (GEIGER et al., 1983 a et b).

L'augmentation du volume cellulaire ainsi que le cloisonnement des cellules retardent également, et momentanément, l'invasion des tissus. Toutefois, compte tenu de la ponctualité du phénomène, les conséquences sur l'évolution de l'infection apparaissent globalement négligeables. Néanmoins, chez certaines variétés de plantes cultivées, telles que les Agrumes (de VALLAVIELLE, 1980) et l'Arachide (HARRIS et BEUTE, 1982), ces réactions constituent un mécanisme de la résistance.

Les réponses de l'hôte au niveau pariétal ne modifient peu ou pas la progression de la pourriture. Les tyloses et les dépôts de callose obligent les filaments mycéliens à les contourner ; les papilles, au contraire n'offrent aucun obstacle aux hyphes. Ceux-ci les détruisent par l'intermédiaire de glucanases excrétées (GEIGER, résultats non publiés). La néogénèse tissulaire, par contre, rejette les tissus nécrosés vers l'extérieur de la racine. Les nouveaux tissus différenciés, sont indemnes de toute contamination et, dans certains cas, la plante guérit.

Au plan de la pathogénèse, la comparaison de ces résultats avec le modèle C.O.D.I.T. (Compartmentalization of Decay In Tree, défini par SHIGO et MARX, 1977) permet de tirer certains enseignements. Ce modèle, fondé sur quatre "barrières", limite l'extension du champignon (parasite ou saprophyte) responsable d'une pourriture du bois (SHORTLE, 1979). Ces barrières se définissent comme suit :

- la barrière 1 : elle limite la progression verticale du parasite par l'obstruction des vaisseaux ;
- les barrières 2 et 3 : elles limitent respectivement l'extension radiale des hyphes (parallèle aux rayons du bois) et leur progression tangentielle (perpendiculaire aux rayons du bois) ;
- la barrière 4 : elle empêche le développement de la nécrose dans les tissus libéro-ligneux différenciés après l'attaque fongique.

MODELE C.O.D.I.T.	REACTIONS DE L'HEVEA	ETAPE DU PROCESSUS INFECTIEUX	PARASITE
Barrière 1	• Obturation des vaisseaux	• Colonisation du xylème	<i>R.l.</i> ; <i>P.n.</i>
	• Formation d'une nouvelle couche pariétale	• Colonisation du xylème	<i>R.l.</i>
	• Tyloses	• Colonisation du xylème	<i>R.l.</i> ; <i>P.n.</i>
Barrière 2	• Obturation des pores des tubes	• Colonisation du phloème	<i>R.l.</i> ; <i>P.n.</i>
Barrière 2 & 3	• Lignification et subérification	• Pénétration et colonisation des tissus corticaux et du cylindre central	<i>R.l.</i> ; <i>P.n.</i>
	• Formation de papilles	• Colonisation des tissus corticaux	<i>R.l.</i>
	• Hyperplasie et hypertrophie cellulaire	• Pénétration	<i>P.n.</i> ( <i>R.l.</i> )
	• Stimulation du cambium subéro-phello-dermique	• Pénétration et colonisation des tissus corticaux	<i>R.l.</i> ( <i>P.n.</i> )
Barrière 4	• Néogénèse tissulaire	• Dégradation du xylème	<i>R.l.</i> ( <i>P.n.?</i> )

TABLEAU IX : Comparaison réactions de l'Hévéea -  
modèle C.O.D.I.T.

(*R.l.* : *R.lignosus*    *P.n.* : *P.noxius*)

La barrière 1 est la moins énergétique, alors que la barrière 4 réagit très efficacement contre les attaques parasitaires.

Le tableau IX compare certaines des réactions de l'Hévéa avec ce modèle.

Dans un premier temps, on constate que le modèle C.O.D.I.T. s'applique non seulement aux réactions différenciées dans le bois mais également à celles initiées dans les tissus non lignifiés.

Dans un second temps, il apparaît, d'après ce tableau, que ces réactions ont un rôle défini dans le déroulement de la pathogénèse. Elles interviennent d'une manière séquencée et sélective en fonction de la nature de la progression de la maladie (verticale, radiale ou tangeantielle). Le modèle C.O.D.I.T. montre que dans les couples Hévéa - agents de pourridié, il n'y a pas de chronologie rigoureusement établie en ce qui concerne l'apparition de ces réactions, du moins pour le clone GT<sub>1</sub> étudié.

Cette remarque explique qu'une réaction histologique donnée n'est différenciée qu'en réponse à une situation bien déterminée du processus infectieux. Elle traduit, en outre, la constance de certaines réactions (celles intervenant au cours de la pénétration, par exemple) ainsi que la faible fréquence d'autres manifestations histologiques (néogénèse tissulaire). Cette analyse succincte confirme enfin que le modèle C.O.D.I.T. est applicable aux pourritures racinaires, en accord avec TIPPET et SHIGO (1980 et 1981).

L'efficacité globale de l'ensemble de ces réactions est en revanche difficilement appréciable. Elles contribuent néanmoins pour certains individus à une certaine "résistance partielle" de la plante à la maladie. En effet, des individus du clone GT<sub>1</sub> infectés par *R. lignosus* (souche 1), présentent une phase de tolérance au parasite au cours de laquelle l'infection stagne (NICOLE et al., 1983 a). Cet état de parasitisme contenu, au sens de MURRAY (1934), résulterait de la conjonction des réactions morphologiques, histologiques et biochimiques.

## 5. Interrelations des réactions histologiques avec le métabolisme de l'hôte.

Les changements histopathologiques au sein d'une plante jouent un rôle important dans les défenses de l'hôte.

Certaines des réactions décrites ci-dessus résultent d'une stimulation de mécanismes préexistants, tels ceux observés dans le cas d'une résistance constitutive. D'autres réactions, en revanche, dépendent de l'initiation de mécanismes nouveaux, élaborés dans le cas de la résistance induite ou acquise. Pour les deux types de mécanismes, les réactions peuvent être localisées au point de pénétration ou se développent à une certaine distance de l'impact initial, comme l'a décrit SEQUEIRA (1983). Dans les deux cas, selon la brutalité de l'attaque, le métabolisme de l'hôte est plus ou moins affecté. L'examen de la figure 7 suggère une intervention de la plante à deux niveaux fondamentaux ; l'un concerne le métabolisme des constituants cellulaires primaires, et l'autre concerne le métabolisme hormonal.

Dans le premier cas, les voies métaboliques des oses, des acides gras et de l'acide shikimique participent à l'élaboration des structures réactionnelles. Celles de l'acide shikimique sont toutefois particulièrement sollicitées par le système défensif de l'hôte (lignines et phénols). Elles interviennent en effet à tous les niveaux de l'infection. McLAUGHLIN et SHRINER (1980) confortent cette observation et, dans ce sens, RIDE (1978) insiste sur le rôle déterminant des parois lignifiées dans la résistance à certaines attaques fongiques. D'une manière générale, le métabolisme de l'acide shikimique est considéré comme prépondérant dans les mécanismes de résistance aux parasites causant les pourritures du bois.

Le second niveau d'intervention de l'Hévéa concerne la régulation de ces mécanismes histologiques. La bibliographie révèle que les réactions liées aux phénomènes tissulaires sont pour la plupart sous contrôle hormonal (HOQUE, 1983). Ainsi, d'après BECKMAN (1980), les auxines et les gibbérellines contrôlent la réorganisation des tissus et la plasticité pariétale. Les effets

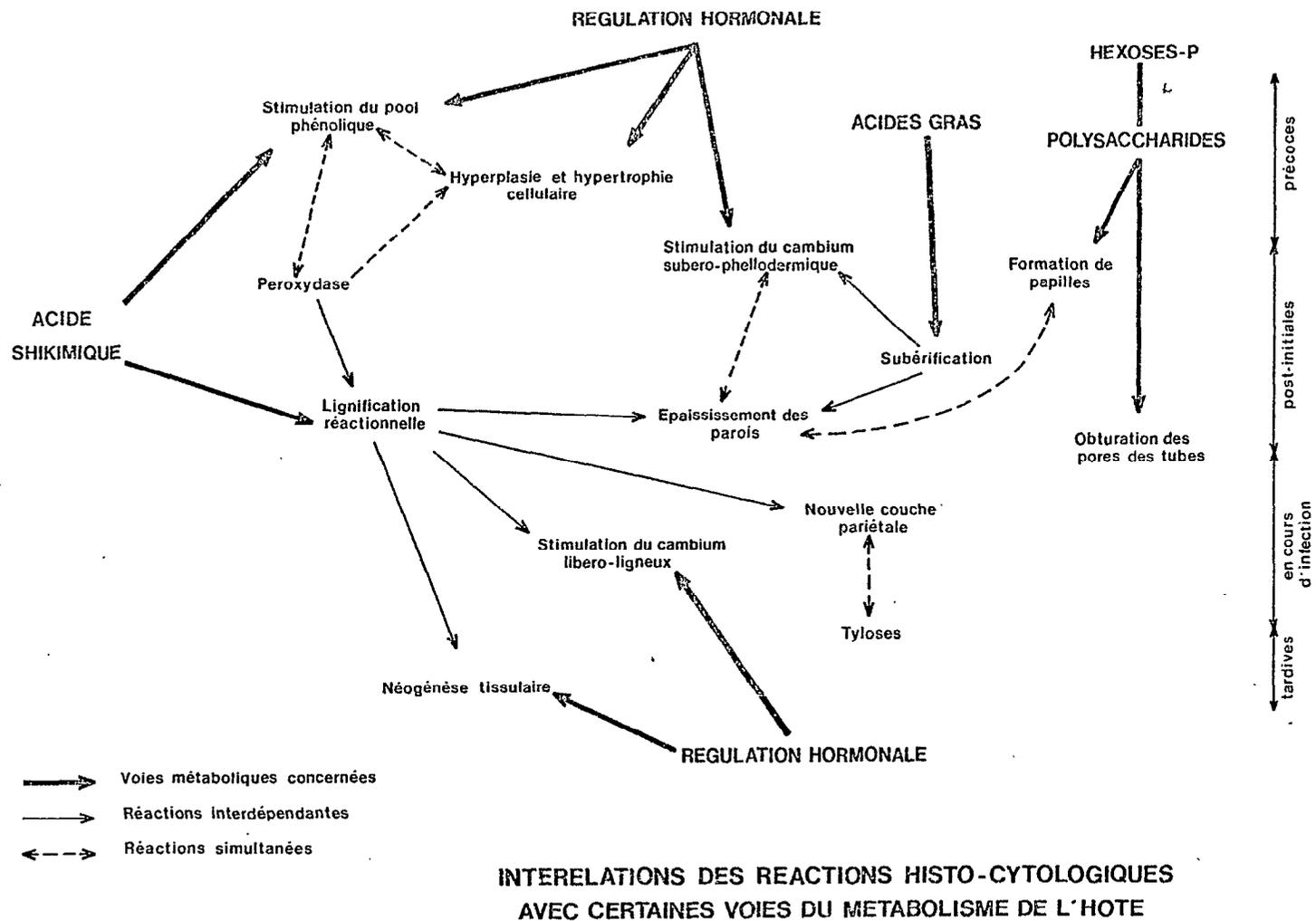


Figure 7 : Interrelations des réactions histologiques avec le métabolisme de l'hôte.

de l'éthylène sur la composition des parois (ESQUERRE-TUGAYE et *al.*, 1979 ; TOPPAN et *al.*, 1982) et leur lignification (VANCE et *al.*, 1980), ou sur la stimulation d'une activité enzymatique (TOPPAN et ROBY, 1982), mettent en exergue, selon PEGG (1976), l'importance de cette hormone dans les mécanismes de la résistance. Dans le cas des pourritures racinaires de l'Hévéa une participation du métabolisme hormonal en réponse à l'agression a été indirectement mis en évidence (NICOLE et *al.*, 1983 a). Très souvent, l'attaque par *R. lignosus* s'effectue par l'extrémité des jeunes pivots ; la destruction de l'apex racinaire induit l'élongation et l'hypertrophie des racines latérales ainsi que la différenciation d'un nouvel axe orthotrope. C'est un cas typique de rupture de la dominance apicale et, partant, de la mise en oeuvre d'une régulation hormonale.

L'intervention d'hormones dans les mécanismes de défense des ligneux soumis à une agression externe a récemment fait l'objet d'une revue détaillée, plus particulièrement en ce qui concerne les conifères (HOQUE, 1983). Cet auteur souligne ainsi l'absence de spécificité de la régulation hormonale des mécanismes de défense. Il précise également que l'apparition des symptômes de la maladie est reliée au déséquilibre hormonal et que l'application de substances de croissance sur une plante peut conduire à la différenciation de réponses morphologiques similaires à celles initiées par la plante lors d'une agression.

## CONCLUSION

Les résultats exposés dans ce chapitre, montrent sans ambiguïté l'aptitude d'*H. brasiliensis* (clone GT1) à réagir contre *R. lignosus* (souche 1) et *P. noxius* (souche 4). La survie de certains arbres, et plus rarement, la guérison d'autres m'autorisent à parler de réactions de défense. Leur sélectivité, bien qu'elle suppose une certaine spécialisation dans les interactions hôte-parasite, ne permet pas, au stade actuel des connaissances acquises, de préciser si ces réactions sont constitutives ou induites. En outre, elles sont intrinsèquement aspécifiques car elles ont en effet toutes déjà été décrites sur d'autres couples. Ceci traduit une problématique commune aux recherches généralement menées sur la résistance des ligneux aux agents de pourridié, qui a été largement commentée par JOHANSSON et UNESTAM (1982). A ce titre, il est probable qu'interviennent des mécanismes de reconnaissance entre le système racinaire et le parasite. Selon GRANITI (1976), chez les agents de pourridié, ils dépendent du type de pourriture occasionnée (brune ou blanche, molle ou sèche), les enzymes responsables étant effectivement excrétées en fonction de la nature des tissus hôtes. Ce mécanisme suffirait à alerter le système défensif de l'hôte et à éliciter les premières réactions.

Il convient enfin de préciser que les mécanismes réactionnels décrits ici sur le clone GT1 peuvent servir d'éléments de comparaison, mais non de modèle, aux autres clones atteints de pourriture racinaire. Et ce, pour deux raisons :

1. la méconnaissance de la sensibilité de ces clones à *R. lignosus* et *P. noxius*, dans les conditions expérimentales mises au point en laboratoire,
2. l'extrême variabilité du pouvoir pathogène existant au sein des populations de ces deux champignons (NICOLE et al., 1983 b).

CONCLUSION GENERALE

12

13

Inscrit dans la programmation de la recherche scientifique ivoirienne, l'étude des relations Hévée - Agents de Pourridiés vise à élargir les connaissances fondamentales de ces interactions, tant au niveau des populations (hôtes et parasites) qu'au niveau du couple proprement dit.

Ce mémoire décrit quelques aspects de la biologie et de l'histo-pathologie du parasitisme de *Rigidoporus lignosus* (souche 1) et *Phellinus noxius* (souche 4) sur *Hevea brasiliensis* (clone GT1).

La première étape de ce travail a consisté en la mise au point d'une technique d'infection artificielle de jeunes plants d'Hévée. Le contrôle de l'âge de l'inoculum et de l'humidité du sol a été déterminante dans la réussite des infections. Ainsi pour *R. lignosus* un inoculum constitué de bâchettes colonisées depuis onze mois, et placé contre la racine à 20 cm de la surface du sol dont l'humidité volumique est égale à 21 %, produit un taux de mortalité voisin de 60 % des plantes infectées. Pour *P. noxius* par contre, un inoculum de 5 mois placé dans le sol à 14 % Hv, cause la mort ou le dépérissement de 40 % des effectifs. Ce protocole permet ainsi d'obtenir, en moins de 5 mois, des plantes infectées à tout les stades du processus infectieux, facilitant de ce fait une étude minutieuse des interactions hôte-parasite.

La contamination et la pénétration par *R. lignosus* sont différentes de celles effectuées par *P. noxius*.

Pour *R. lignosus*, la transformation du mycélium de propagation en mycélium infectieux est une étape prépondérante de l'agression de l'hôte. Elle se traduit, au niveau cellulaire, par une diminution importante de l'épaisseur de la paroi fongique dont le corrolaire semble être la sécrétion active d'enzymes extracellulaires. La pénétration de ces hyphes dans la racine s'effectue soit mécaniquement soit chimiquement. Dans ce dernier cas, la différenciation de structures spécialisées, apparentées aux haustoria, a souvent été décrite aussi bien en position intracellulaire qu'en position intercellulaire.

En ce qui concerne *P. noxius*, le mode de contamination est très différent du fait de l'absence de rhizomorphes ; elle ne se réalise en effet que lorsqu'il y a contact intime avec la racine. Enfin, la pénétration des hyphes dans les premières assises cellulaires résulte d'une intervention enzymatique sans action mécanique conjointe apparente.

La colonisation et la dégradation des tissus non lignifiés de l'hôte est similaire pour chacun des parasites. L'ensemble des constituants pariétaux (subérine, pectine et cellulose) sont dégradés mais à des degrés variables selon le champignon. Les perturbations provoquées par *P. noxius* sont en effet plus drastiques que celles causées par *R. lignosus*, compte tenu de l'activité supérieure des hydrolases excrétées (GEIGER et *al.*, 1983 a).

Dans les deux cas, le phloème est particulièrement atteint par l'infection. Les cellules à tannins augmentent en effet leur production de polyphénols. De même, les modifications du système laticifère conduit, à terme, à la coagulation du caoutchouc. Celle-ci est consécutive à une déstabilisation des particules vacuolaires (lutoïdes entr'autres) libérant les facteurs coagulants.

La colonisation et la dégradation des tissus racinaires lignifiés ont été abordés "*in vivo*" et "*in vitro*" pour les deux champignons.

Pour *R. lignosus*, la colonisation du xylème est rapide. "*In vivo*", la dégradation des parois des cellules du bois est sélective ; elle débute au niveau de la lamelle moyenne et s'étend vers la paroi secondaire. Les fractions ligneuses (lamelle moyenne et paroi primaire surtout) sont fortement digérées, alors que la couche S<sub>3</sub> de la paroi secondaire n'est que faiblement atteinte. "*In vitro*" la dégradation est sélective, mais elle s'oriente dans le sens paroi secondaire - lamelle moyenne. Dans ce cas, le parasite différencie de nombreuses microhyphes dont le rôle est d'attaquer la paroi primaire et la lamelle moyenne.

L'attaque du xylème par *P. noxius* est plus lente. "In vivo" les différentes fractions pariétales sont digérées simultanément. "In vitro" la dégradation s'amorce à partir de la fraction S<sub>3</sub> puis se généralise par la suite à l'ensemble des constituants. Les fractions riches en oses sont néanmoins les plus altérées.

Les réactions de défense de l'Hévéa à ces agressions parasitaires sont multiples. Dès les premières pénétrations des hyphes dans la racine, des réactions précoces se différencient. L'hypertrophie et l'hyperplasie cellulaires ainsi que la stimulation du pool phénolique en sont les plus caractéristiques.

Les réactions post-initiales sont élaborées lors de la colonisation des premières assises cellulaires. Le fonctionnement du cambium subéro-phellodermique est exalté et conduit à la mise en place d'assises corticales surnuméraires sous les points de pénétration. Corrélativement, certains parois cellulaires se lignifient ou se subérifient.

Les réactions intervenant au cours de la colonisation de la racine concernent l'ensemble des tissus. Dans le liège et le liber, des dépôts ont été observés au contact des parois. La callose est l'un des constituants qui intervient dans leur composition. Dans le xylème, le fonctionnement du cambium libéro-ligneux est également perturbé ; on assiste en effet à une activation du processus de lignification des jeunes cellules cambiales. Au niveau cellulaire enfin, une nouvelle couche pariétale est différenciée dans certains vaisseaux.

Une réaction tardive, et très rare, a été décrite sur quelques plantes infectées ; elle concerne l'ensemble des tissus dégradés et consiste en une néogénèse tissulaire. Des foyers cellulaires à caractère méristématique s'initient en effet à partir des rayons parenchymateux du xylème et un nouveau cambium libéro-ligneux produit un liber et un bois sains.

Globalement, seule la réaction tardive est efficace car elle élimine le parasite des tissus hôtes en différenciant

des tissus réactionnels apparemment "résistants". Certaines des autres réactions par contre, ne contiennent que localement le champignon. L'intégration de ces données selon le modèle C.O.D.I.T. (Compartementalization of Decay In Tree) montrent que ces réactions répondent à une situation parasitaire précise, fonction de l'évolution de la pourriture du bois.

Le travail rapporté ici a permis, en définitive, de montrer :

- la sophistication du système d'infection artificielle des jeunes Hévéa ;
- le comportement de ces champignons dans les tissus racinaires ;
- les conséquences de l'agression parasitaire sur l'organisation tissulaire et cellulaire de l'hôte ;
- certains mécanismes réactionnels mis en oeuvre par la plante pour assurer sa défense.

Il mériterait une étude complémentaire sur deux points particuliers :

- l'aspect cyto-enzymologique des mécanismes de l'agression de l'hôte ;
- la caractérisation d'éventuels éliciteurs de ces réactions de défense.

BIBLIOGRAPHIE

- AIST J.R., 1976.- Papillae and related wound plugs of plant cells. Ann. Rev. Phytopathology, 14, 145-163.
- AKAI S., 1959.- Histology of defense in plants, in Plant Pathology, ed. by HORSFALL J.G. et DIMOND A.E., Academic Press, New-York et London.
- AKAI S. et FUKUTOMI M., 1980.- Preformed internal physical defenses, in Plant Disease, vol. V : How plants defend themselves, ed. by HORSFALL J.G. et COWLING E.B. Academic Press, New-York, London, Toronto, Sydney et San Francisco.
- ALTSON R.A., 1953.- Annual Report for 1949-1951 of the pathological division of the Rubber Research Institute of Malaya.
- ANDER P. et ERIKSSON K.E., 1976.- The importance of phenol oxydase activity in lignin degradation by the white rot fungus *Sporotrichum pulverulentum*. Arch. Microbiol., 109, 1-58.
- ANDER P. et ERIKSSON K.E., 1978.- Lignin degradation and utilization by microorganism. Progr. Ind. Microbiol., 14, 1-58.
- D'AUZAC J., CRETIN H., MARIN B. et LIORET Cl., 1982.- A plant vacuolar system : the lutoids from *Hevea brasiliensis* latex. Physiol. vég., 20 (2), 311-331.
- BAREYRE M.J. et BOISSON C., 1969.- Relation entre la morphogénèse de l'appareil végétatif non agrégé de *Leptoporus lignosus* (K1). Heim et le métabolisme respiratoire des filaments caractéristiques des deux phases du développement. C.R. Acad. Sci., série D, 268, 2256-2259.
- BARTNICKI-GARCIA S., 1968.- Cell wall chemistry, morphogenesis and taxonomy of fungi. Ann. Rev. Microbiol., 22, 87-108.
- BATEMAN D.F. et BASHAM M.G., 1976.- Degradation of plant cell walls and membranes by microbial enzymes. In Physiological Plant Pathology, ed. by HEITEFUSS et WILLIAMS. Springer - verlag, Berlin, Heidelberg et New-York.
- BECKETT A., HEATH I.B. et Mc LAUGHLIN D.J., 1974.- An atlas of fungal ultrastructure. Longman gr. Ltd., London.

- BECKMAN C.M., 1980.- Defenses triggered by the invader : physical defenses. In Plant Disease, an advanced treatise, vol. V : How plant defend themselves. Ed. by HORSFALL J.G. et COWLING E.B. Academic Press, New-York, London, Toronto, Sidney et San Franscisco.
- BIGGS A.R., DAVIS D.D., et MERRIL W., 1983.- Histopathology of cankers on *Populus* caused by *Cytospora chrysosperma*. Can. J. Bot., 61, 563-574.
- BLANCHETTE R.A., 1979.- Cell wall decomposition by *Phellinus* (*Fomes*) *Pini*. Phytopathology, 69 (8), 913.
- BLANCHETTE R.A., 1982 a.- Decay and canker formation by *Phellinus pini* in white and balsam fir. Can. J. For. Res., 12 (3), 538-544.
- BLANCHETTE R.A., 1982 b.- Progressive stages of discoloration and decay associated with the canker-rot fungus. *Inonotus obliquus* in Birch. Phytopathology, 72, 1272-1277.
- BLAND D.E., FOSTER R.C. et LOGAN A.F., 1971.- The mechanism of permanganate and osmium tetroxyde fixation and the distribution of lignin in the cell wall of *Pinus radiata*. Holzforschung, 25, 137-143.
- BOBILIOFF, D.W., 1923.- Anatomy and physiology of *Hevea brasiliensis*. Part I : Anatomy of *Hevea brasiliensis*. Zürich : ART. Inst. Orell Füssli.
- BOISSON C., 1968 a.- Constitution et évolution du thalle du *Leptoporus lignosus* (K1) Heim. Relation entre les formes mycéliennes et la différenciation des rhizomorphes. Agro. Trop., 12, 1328-1334.
- BOISSON C., 1968 b.- Mise en évidence de deux phases mycéliennes successives au cours du développement du *Leptoporus lignosus* (K1) Heim. C.R. Acad. Sci., série D, 166, 1112-1115.
- BOISSON C., 1973.- De la basidiospore au rhizomorphe, déterminisme de l'agrégation chez le basidiomycète *Leptoporus lignosus* (K1) Heim ex Pat. Thèse d'Etat, Paris.
- BOISSON C., DECLERT C., GEIGER J.P., HUGUENIN B., NANDRIS D., et NICOLE M., 1983.- Rubber root rot : the ORSTOM's approach. Poster, 6<sup>th</sup> Coll. IUFRO on "Root and Bot Rot", Melbourne, Août.

- BOTTON B., 1978.- Quelques aspects de la croissance rhizomorphique chez le *Sphaerostilbe repens*. Experientia, 34, 1005-1007.
- BRACKER C.E., 1967.- Ultrastructure of fungi. Ann. Rev. Phytopathology, 5 : 343-374.
- BRAUN E.J. et SINCLAIR W.A., 1976.- Histopathology of phloem necrosis in *Ulmus americana*. Phytopathology, 66, 598-607.
- BRAUNS F.E. et BRAUNS D.A., 1952.- The chemistry of lignin, 808pp. Academic Press, New-York.
- BRZOWSKA-HANOWER J., HANOWER P. et LIORET C., 1978.- Etude du mécanisme de la coagulation du latex d'*Hevea brasiliensis* (Kunth) Müll. Arg. II. Systèmes enzymatiques impliqués dans le processus. 1. Phénol oxydases. Physiol. vég., 16 (2), 231-254.
- BRZOWSKA-HANOWER J., CRETIN H., HANOWER P. et MICHEL P., 1979.- Variations du pH entre compartiments vacuolaire et cytoplasmique au sein du latex d'*Hevea brasiliensis*. Influence saisonnière et action du traitement par l'éthrel générateur d'éthylène. Répercussion sur la production et l'apparition d'encoches sèches. Physiol. vég., 17 (4), 851-867.
- BURNETT J.H. et TRINCI A.P.J., 1978.- Fungal walls and hyphal growth. Ed. by BURNETT J.H. et TRINCI A.P.J.. Cambridge University Press, Cambridge.
- BUSHNELL W.R., 1972.- Physiology of fungal haustoria. Ann. Rev. Phytopathology, 10, 151-176.
- BUVAT R., 1969.- La cellule végétale. Univers des connaissances. Hachette Ed., Paris.
- CALONGE F.D., 1969.- Ultrastructure of the haustoria or intracellular hyphae in four different fungi. Arch. Mikrobiol., 67, 209-225.
- CAMPBELL A.H., 1934.- Zone lines in plant tissues. II. The black lines formed by *Armillaria mellea* (Vahl) Quelet. Ann. Appl. Biol., 21 (1), 1-22.
- CARTWRIGHT K. St. G., 1927.- A satisfactory method of staining fungal mycelium in wood sections. Ann. Bot., 43, 412-413.

- CATESSON A.M., 1980.- Les tissus végétaux. Dans "les polymères végétaux, polymères pariétaux et alimentaires non azotés". Gauthier - Villars, Paris, 1-29.
- CHET I. et HUTTERMAN A., 1980.- Chemical composition of hyphal walls of *Fomes annosus*. Eur. J. For. path., 10, 65-70.
- CHOU C.K. et LEVI M., 1971.- An electron microscopical study of the penetration and decomposition of tracheid walls of *Pinus sylvestris* by *Poria vaillantii*. Holzforschung, 25, 107-112.
- CORBETT N.M., 1963.- Anatomical, ecological and physiological studies of microfungi associated with decaying wood. Ph. D. thesis, University of London.
- COUCHAT P., 1974.- Mesure neutronique de l'humidité des sols. Thèse Doct. d'Etat. Université Paul Sabatier, Toulouse.
- COWLING E.B., 1961.- Comparative biochemistry of the decay of sweetgum sapwood by white rot and brown rot fungi. U.S.D.A., Techn. Bull. 1258, 79pp.
- COWLING E.B., 1965.- Microorganism and microbial enzyme systems as selective tools in wood anatomy. In cellular ultrastructure of woody plants. Ed. by W.A. COTE, Syracuse University Press, Syracuse.
- CRETIN H. et BANGRATZ J., 1983.- Une activité enzymatique endogène NAD(D)H<sup>+</sup> dépendante, responsable de la dégradation peroxydative des organites membranaires et de la coagulation précoce, ou "*in situ*", du latex d'*H. brasiliensis*. C.R.Acad. Sc. Série III, 296, 101-106.
- CZANINSKY Y., 1979.- Cytochimie ultrastructurale des parois du xylème secondaire. Biol. Cellulaire, 35, 97-102.
- DAY W.R., 1948.- The penetration of conifer roots by *Fomes annosus*. Quart. J. For. 32, 99-101.
- DECLERT C., 1960.- Une technique de détection des agents de Pourridié, la bûchette piège. Son application à l'étude de *Leptoporus lignosus*. Rev. Mycol. 26, 119-127.
- DE JONG, W.H., 1933.- Het parasitisme van *Rigidoporus microporus* (Schwartz) van Overeem, Syn.: *Fomes lignosus* Klotzsch, bij *Hevea brasiliensis*. Arch. Rubber Cult. 17, 83.

- DELATOUR, 1977.- Les hôtes du *Fomes annosus* (Fr.) en France. Eur. J. For. Path., 71 , 188-190.
- DICKENSON P.B., 1969.- Electron microscopical studies of latex vessel system of *Hevea brasiliensis*. J. Rubb. Res. Inst. Malaya, 21 (4) , 543-559.
- DICKMAN M.B., PATIL S.S. et KOLATTUKUDY M.E., 1982.- Purification, characterization and rôle in infection of an extracellular cutinolytic enzyme from *Colletotrichum gloeosporioides* Penz. on *Carica papaya* L. Physiol. Plant Pathol., 20 , 333-347.
- DIROL D., 1976.- Etude *in vitro* de la colonisation et de la dégradation structural du bois de Hêtre par *Coriolus versicolor* (L.) Quelet. Rev. Mycol., 40 , 295-306.
- DIROL D. et RAVILLY F., 1979.- Les différentes formes d'altération de la paroi cellulaire par quelques champignons lignivores. Ann. Biol., 18 (11-12) , 477-492.
- ENGLERTH, G.H., 1942.- Decay of western hemlock in Western Oregon and Washington. Yale Univ. School of Forestry Bull. 50 , 53p.
- EHRlich M.A. et EHRlich H.G., 1971.- Fine structure of the host parasite interface in mycoparasitism. Ann. Rev. Phytopathology, 9 , 135-184.
- ERIKSSON K.E., 1981.- Fungal degradation of wood components. Pure et Appl. Chem., 53 , 33-43.
- ERIKSSON K.E., GRÜNEWALD A., NILSSON T. et VALLANDER L., 1980.- A scanning electron microscopy study of the growth and attack on wood by three white rot Fungi and their cellulase less mutants. Holzforschung, 34 (6) , 207-213.
- ESCHRICH W. et CURRIER H.B., 1964.- Identification of callose by its diachrome and fluorochrome reactions. Stain tech. 39 , 303-307.
- ESQUERRE-TUGAYE M.T., LAFITTE C., MAZEAU D., TOPPAN A. et TOUZE A., 1979.- Cell surfaces in plant microorganism interactions. II. Evidence for the accumulation of hydroxy proline-rich glycoproteins in the cell wall of diseased plants as a defense mechanism. Plant Physiol., 64 , 320-326.

- FAÏ(de) E., 1981.- Histophysiologie comparée des écorces saines et pathologiques (maladie des encoches sèches) de l'*Hevea brasiliensis* Thèse, 3ème cycle. USTL, Montpellier.
- FAÏ (de) E. et HEBANT C., 1980.- Etude histologique des écorces d'*Hevea brasiliensis* atteint de la maladie des encoches sèches. C.R. Acad. Sc. Paris, Série III, 291, 865-968.
- FENTON E.W., 1943.- Some observations on heart rot in conifers from an ecological point of view. Forestry, 17, 55-60.
- FOX R.A., 1961.- White root disease of *Hevea brasiliensis*. The identity of the pathogen. Proc. Nat. Rubb. Res. Conf. Kuala Lumpur, 1960, 473-482.
- GARRETT S.D., 1970.- Pathogenic root-infecting fungi. Cambridge University Press, Cambridge.
- GEIGER J.P., 1975.- Aspects physiologiques et biochimiques de la spécialisation parasitaire de *Corticium rolfsii* (Sacc.) Curzi et *Leptoporus lignosus* (Kl.) Heim. Thèse Doct. 3e cycle. Université de Paris-Sud, Paris.
- GEIGER J.P. et GOUJON M., 1977.- Etude de deux peroxydases différentes extraites des tissus racinaires d'Hévéa sains et parasités par *Leptoporus lignosus* (Kl.) Heim. C.R. Acad. Sc., Paris, Série D, 284, 1053-1056.
- GEIGER J.P. et HUGUENIN B., 1981.- La peroxydase de tissus racinaires d'Hévéa parasités par *R. lignosus* : origine et rôle physiologique potentiel. Abs. Cong. Prot. Cult. Trop., Sect. 1B, 43, Lyon, Juillet.
- GEIGER J.P., NANDRIS D., GOUJON M., 1976.- Activité des laccases et des peroxydases au sein des racines d'Hévéa attaquées par le pourridié blanc (*Leptoporus lignosus* Kl. Heim). Physiol. Vég., 14 (2), 271-282.
- GEIGER J.P., NANDRIS D., NICOLE M. et HUGUENIN B., 1981.- Les pourridiés de l'Hévéa. II. Etude de l'agression du système racinaire de l'Hévéa par *Rigidoporus lignosus* et *Phellinus noxius*. Abs. Cong. Protection des cultures tropicales, section 1B, 43, Lyon, Juillet.

- GEIGER J.P., NICOLE M., NANDRIS D. et HUGUENIN B., 1983 a.- Comparative studies of Rubber root rot caused by *Rigidoporus lignosus* and *Phellinus noxius* in Ivory Coast : physiological, biochemical and cytological aspects of host parasite interactions. Poster 6e Coll. IUFRO on "Root and But Rot", Melbourne, Août.
- GEIGER J.P., HUGUENIN B., NANDRIS D. et NICOLE M., 1983 b. - Effect of an extracellular laccase of *Rigidoporus lignosus* on *Hevea brasiliensis* lignin. Poster, at lignocellulose biodegradation conference, Littlehampton, Septembre.
- GIBSON I.A.S., 1975.- Diseases of forest widely planted as exotics in the tropic and southern hemisphere. Comm. For. Inst., I, 42-49.
- GIORDANI R., 1980.- Dislocation du plasmalemme et libération de vésicules pariétales lors de la dégradation des parois terminales durant la différenciation des laticifères articulés. Biol. Cell., 38 (3), 231-236.
- GIORDANI R., 1981.- Activités hydrolasiques impliquées dans le processus de dégradation pariétal durant la différenciation des laticifères articulés. Biol. Cell., 40 (3), 217-224.
- GLAUERT A.M., 1975.- The fixation, embedding and staining of biological specimens. In "technique for electron microscopy". Desmond Kay Ed., Blackwell Scientific Publ. Oxford, 1967, 193.
- GRANITI A., 1976.- Tissue and organ specificity in plant diseases. In "Specificity in Plant Diseases". Ed. by RKS. WOOD et GRANITI A., Plenum Press, New-York et London.
- GREIG J.W., 1976.- Host plants of *Fomes annosus* in Great Britain. Trans. Br. Mycol. Soc., 66 (3), 517-558.
- GUILLAUMIN J.J., 1977.- Apricot root rot, *Armillariella mellea* (Vahl) Karst. EPPO Bull., 7 (1), 125-135.
- HALL J.L., 1978.- Electron microscopy and cytochemistry of plant cells. Ed by HALL J.L., Biomedical Press, Amsterdam.
- HANOWER P., BRZOWSKA J. et LIORET C., 1976.- Etude du mécanisme de la coagulation du latex d'*Hevea brasiliensis* (Kunth) Müll. Arg. I. Facteurs agissant sur la coagulation. Physiol. Veg., 14 (4), 677-693.

- HAMMERSCHMIDT R. et KUC J., 1982.- Lignification as a mechanism for induced systemic resistance in cucumber. Physiol. Plant Pathol., 20, 61-71.
- HARRIS N.E. et BEUTE M.K., 1982.- Histological responses of Peanut germplasm resistant and susceptible to *Cylindrocladium crotalariae* in relationship to inoculum density. Phytopathology, 72 (9), 1250-1256.
- HEATH M.C., 1980.- Reactions of non suspects to fungal pathogens. Ann. Rev. Phytopathology, 18, 211-236.
- HEBANT C., 1981.- Ontogenie des laticifères du système primaire de l'*Hevea brasiliensis* : étude ultrastructurale et cytochimique. Can. J. Bot., 59 (6), 974-985.
- HEBANT C., et FAÏ (de) E., 1980.- Fonctionnal organization of the bark of *Hevea brasiliensis* (rubber tree) : a structural and histoenzymological study. Z. Pflanzen Physiol., 97, 391-398.
- HESS W.M., 1966.- Fixation and staining of fungus hyphae and host plant root tissues for electron microscopy. St. Technol., 41 (1), 27-35.
- HOHL H.R., STOSSEL P. et HÄCHLER H., 1980.- Papilla formation and partial inhibition of fungal glucanases by phytoalexines in the *Phytophthora infestans* - *solanum tuberosum* system. Ann. Phytopathol., 12 (4), 353-362.
- HOQUE B.E., 1983.- Biochemical aspects of stress physiology of plants and some considerations of defense mechanisms in conifers. Eur. J. Pl. Pathology, 12 (4-5), 280-296.
- HORSFALL J.C. et COWLING E.B., 1980.- Plant disease, an advanced treatise. Vol. V, How plants defend themselves. Ed. by HORSFALL J.C. et COWLING E.B., Academic Press, New-York.
- JENSEN W.A., 1962.- Botanical histochemistry. Ed. by F.W.M. FREEMAN et COMPANY, San-Fransisco et Londres.
- JOHANSEN, D.A., 1940.- Plant microtechnique. Mc Grow-Hill ed. New-York.
- JOHANSSON M. and UNESTAM T., 1982.- The search for resistance to *Heterobasidion* root rot in Norway Spruce : old and new approaches in studies of infection biology. Eu. J. For. Pathol., 6-7, 346-357.

- JOHN K.P., 1958.- Inoculation Experiment with *Fomes lignosus*.  
Klotzsch. J. Rubb. Res. Inst. Malaya, 15, 223-240.
- JOHN K.P., 1961.- Loss of viability of three root parasites in  
infected root sections buried in soil. J. Rubb. Res.  
Inst. Malaya, 16, 173-177.
- JOHN K.P., 1966.- Effect of inoculum size and age of trees on  
root disease infection of *Hevea brasiliensis*.  
J. Rubb. Res. Inst. Malaya, 19, 226-230.
- KAHN S.R. et KIMBROUGH, H.J.W., 1979.- Ultrastructure of septal  
pore apparatus in the lamellae *Nematoloma puiggarii*.  
Can. J. Bot., 57 (19), 2064-2070.
- KIRALY Z., 1980.- Defenses triggered by the invader : hypersen-  
sitivity. In "Plant disease", vol. V : How plants defend  
themselves. Ed. by HORSFALL J.G. et COWLING E.B.  
Academic Press, New-York.
- KIRK T.K., 1971.- Effect of microorganisms on lignin. Ann. Rev.  
Phytopath., 9, 185-210.
- KOLATTUKUDY P.I., 1977.- Lipid polymers and associated phenols,  
their chemistry, biosynthesis and role in pathogenesis.  
In "the structure, Biosynthesis, and degradation of Wood."  
Ed. F.A. LOEWRIS, V.C. RUNECKLES, 185-246. New-York.
- KOLATTUKUDY P.E., 1980.- Biopolyester Membranes of Plants :  
cutin and suberin. Science, 208, 990-1000.
- KOLATTUKUDY P.E., 1981.- Structure, biosynthesis and biodegrada-  
tion of cutin and suberin. Ann. Rev. Plant Physiol., 32,  
539-567.
- KÖLLER W., ALLAN C.R. et KOLATTUKUDY P.E., 1982.- Role of cuti-  
nase and cell wall degrading enzymes in infection of  
*Pisum sativum* by *Fusarium solani* sp. *pisii*. Physiol.  
Plant Pathol., 20, 47-60.
- KOSUGE T., 1969.- The role of phenolics in host response to  
infection. Ann. Rev. Plant Pathol., 7, 195-222.
- KUHLMAN E.G., 1969.- Inoculation of loblolly pine seedlings with  
*Fomes annosus* in the greenhouse. Can. J. Bot., 47,  
2079-2082.

- LANGERON M., 1949.- Précis de microscopie. MASSON et Cie, ed., Paris.
- LIESE W., 1970.- Ultrastructural aspects of woody tissues desintegration. Ann. Rev. Phytopathol., 8, 231-258.
- LIN T.S. et KOLATTUKUDY P.E., 1980.- Isolation and characterization of a cuticular polyester (cutin) hydrolyzing enzyme from phytopathogenic fungi. Physiol. Plant. Pathol., 17, 1-15.
- LIYANAGE G.W., 1977.- Review of the plant pathology department for the year 1977. Bull. Rub. Res. Inst. Sri Lanka, 66-98.
- LIYANAGE G.W., LIYANAGE A. de S., PERIES O.S. et HALANGODA L., 1977.- Studies of the variability and pathogenicity of *Rigidoporus lignosus*. J. Rubb. Res. Inst. Sri Lanka, 54, 362-372.
- LUFT J.H., 1961.- Improvements in epoxy resin embedding methods. J. Bioph. Biochem. Cytol., 9, 409-414.
- MALLET B., et NICOLE M., 1984.- Occurrence of *Armillaria* root rot in Ivory Coast. A parasite dans Plant Disease.
- Mc LAUGHLIN J.B. et SHRINER D.S., 1980.- Allocation of resources to defense and repair. In "Plant Disease", vol. V : How plants defend themselves. Ed. par HORSFALL J.G. et COWLING E.B., Academic Press, New-York.
- MARCHANT R. et MOORE R.T., 1973.- Lomasomes and plasmalemmasomes in fungi. Protoplasma, 76, 235-247.
- MERRILL W. et SHIGO L.A., 1979.- An expanded concept of tree decay. Phytopathology, 69 (10), 1158-1160.
- MONTIES B., 1980.- Les polymères végétaux. Polymères pariétaux et alimentaires non azotées. Gauthier-Villars, Paris.
- MOURICHON X. et SALLE G., 1981.- Etude ultrastructurale des relations hôte-parasite au cours de l'infection des pommes par le *Phytophthora cactorum*. Can. J. Bot., 59 (2), 251-263.

- MULLICK D.B. et JENSEN G.D., 1973.- New concepts and terminology of coniferous periderms : necrophyllactic and exophyllactic periderms. Can. J. Bot., 51, 1459-1470.
- MURRAY R.K.S., 1934.- Diseases of Rubber in Ceylan. Quart Gac. Rubb. Res. Scheme, Ceylan XI, 1, 17-19.
- NANDRIS D., NICOLE M., GEIGER J.P., HUGUENIN B. et GOUJON M., 1981.- Les pourridiés de l'Hévéa. I. Incidence des facteurs édaphiques sur le pouvoir pathogène de *R. lignosus*. Abs. Congr. Protection des cultures tropicales, section 1B, 43, Lyon, Juillet.
- NANDRIS D., NICOLE M. et GEIGER J.P., 1983 a. - Infections artificielles de jeunes plantes d'*Hevea brasiliensis* par *Rigidoporus lignosus* et *Phellinus noxius*. Eur. J. For. Pathol., 13 (2), 65-76.
- NANDRIS D., NICOLE M., GEIGER J.P. et MALLET B., 1983 b. - Root rot diseases in Ivory Coast forest and plantations. Communication, 6<sup>th</sup> Coll. IUFRO on "Root and Butt Rot", Melbourne, Août.
- NICOLE M., 1982.- Masse mycélienne et activité laccase au sein des racines d'Hévéa infectées par *Rigidoporus lignosus*. Physiol. Vég., 20 (3), 465-475.
- NICOLE M., GEIGER J.P., NANDRIS D. et HUGUENIN B., 1981 a. - Les pourridiés de l'Hévéa. III. Réaction de l'Hévéa à l'infection par *R. lignosus* et *P. noxius*. Abst. Congr. Protection des cultures tropicales, sect. 1B, 43, Lyon, Juillet.
- NICOLE M., CRETIN H. et FÄY DE, 1981 b. - Coagulation *in situ* du latex d'*Hevea brasiliensis* lors d'une attaque parasitaire par *Rigidoporus lignosus*, ou d'un stress physiologique : la maladie des encoches sèches. Rapport multigraphié, ORSTOM, 10pp., 7 fig.
- NICOLE M., GEIGER J.P. et NANDRIS D., 1982 a. - Interactions hôte-parasite entre *Hevea brasiliensis* et les agents de pourriture racinaire *Phellinus noxius* et *Rigidoporus lignosus* : étude physiopathologique comparée. Phytopath. Z., 105, 311-326.

- NICOLE M., GEIGER J.P. et NANDRIS D., 1982 b. - Aspects ultra-structuraux de la dégradation du phloème des racines d'*Hevea brasiliensis* par *Rigidoporus lignosus*. C.R. Acad. Sc., Paris, série III, t. 295, 471-476.
- NICOLE M., NANDRIS D., et GEIGER J.P., 1983 a. - Cinétique de l'infection de plants d'*Hevea brasiliensis* par *Rigidoporus lignosus* (Kl.) Imazeki. Can. J. For. Res., 13 (3), 359-364.
- NICOLE M., NANDRIS D. et GEIGER J.P., 1983 b. - Pathotypes of *Rigidoporus lignosus* and *Phellinus noxius* isolated from different hosts in West Africa. Communication, 6<sup>th</sup> Coll. IUFRO on "Root and But Rot", Melbourne, Août.
- NICHOLSON R.L., KUC J. et WILLIAMS E.R., 1972.- Histochemical demonstration of transitory esterase activity in *Venturia inaequalis*. Phytopathology, 62, 1242-1247.
- NOGUCHI A., SHIMADA M. et HIGUCHI T., 1980.- Studies on lignin biodegradation. I. possible role of non specific oxidation of lignin by laccase. Holzforschung 34, 86-89.
- O'BRIEN R.W. et RALPH B.J., 1966.- The cell wall composition and taxonomy of some Basidiomycètes and Ascomycètes. Ann. Bot., 30 (12), 831-843.
- OULETTE G.B., 1981.- Ultrastructural cell wall modification in secondary xylem of American elm surviving the acute stage of Dutch elm disease : fibres. Can. J. Bot., 59 (12), 2425-2438.
- PEARCE R.B., 1982.- A mechanism for compartmentalization in oak. Arbor. J., 6, 277-285.
- PEARCE R.B. et RUTHERFORD J., 1981.- A wound associated suberized barrier to the spread of decay in the sapwood of oak (*Quercus robur* L.). Physiol. Plant Pathol., 19, 359-369.
- PEEK R.D., LIESE W. et PARAMESWARAN N., 1972.- Infection und Abbau des Wurzelholzes von Fichte durch *Fomes annosus*. Eur. J. For. Pathol., 2, 237-248.
- PEGG G.F., 1976.- The involvement of ethylene in plant pathogenesis. In "Physiological Plant Pathology" vol. IV, 582-589. Ed. par HEITFUSS R. et WILLIAMS P.M., Springer-Verlag, Berlin.

- PERIES O.S., 1959.- Studies on the production of toxins by *Fomes lignosus*. I. Preliminary investigations. J. Rubb. Res. Inst. Ceylan, 35 (2), 38-40.
- PERIES O.S., SAMARAWEERA S.K., 1963.- Pure culture inoculation of Hevea roots with *Fomes lignosus*. J. Rubb. Res. Inst. Ceylan, 39 (1 et 2), 16-17.
- 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. INEAC, sér. Tech., 49, 480pp.
- PUJARNISCLE S., 1969.- Etude de quelques facteurs intervenant sur la perméabilité et la stabilité de la membrane des lutoïdes d'*Hevea brasiliensis*. Physiol. vég., 7, 391-403.
- RACHMILEVITZ et FAHN A., 1982.- Ultrastructure and development of the laticifers of *Ficus carica* L. Ann. Bot., 49, 13-22.
- RADTKE D., KILBERTUS G. et MANGENOT F., 1981.- Les mécanismes de pénétration et de propagation des hyphes de *Xanthochrous pini* (Brot.) Pat. et d'*Ascocoryne sarcoïdes* (Jacq. ex Gray) Tul. dans le bois d'oeuvre de Hêtre et de Pin. Holzsforschung, 35, 141-148.
- REEVE R.M., 1959.- Histological and histochemical changes in developing and reopening peaches. I. The catechol tannins. Ann. J. Bot., 46, 210-217.
- REYNOLDS E.S., 1963.- The use of lead citrate at high pH as an electron opaque stain in electron microscopy. J. Cell. Biol., 7, 208-212.
- RIBAILLER D., JACOB J.L. et D'AUZAC J., 1971.- Sur certains caractères vacuolaires des lutoïdes du latex d'*Hevea brasiliensis* Müll. Arg. Physiol. Veg., 9, 423-437.
- RIBAILLER D., 1972.- Quelques aspects du rôle des lutoïdes dans la physiologie et l'écoulement du latex d'*Hevea brasiliensis*. Action de produits libérant de l'éthylène. Thèse d'Etat, Abidjan.

- RIDE J.P., 1975.- Lignification in wounded wheat leaves in response to fungi and its possible role in resistance. Physiol. Plant. Pathol., 5, 125-134.
- RIDE J.P., 1978.- The role of cell wall alterations in resistance to fungi. Ann. Appl. Biol., 89, 302-305.
- RISHBETH, J., 1951.- Observations on the biology of *Fomes annosus*, with particular reference to East England pine plantations. III. Natural and experimental infection of Pines, and some factors affecting severity of the disease. Ann. Bot., 58, 221-247.
- RUEL K., BARNOUD F. et ERIKSSON K.E., 1981.- Micromorphological and ultrastructural aspects of Spruce wood degradation by wild type *Sporotrichum pulverulentum* and its cellulase less mutant cell 144. Holzforschung, 35, 157-171.
- SACCAS A.M., 1975.- Les pourridiés des caféiers en Afrique tropicale. Bull. Inst. Fr. Café Cacao, 13 / 172pp.
- SAKURAI Y., 1952.- Pathologico-anatomical observations on the white root rot of mulberry tree caused by *Rosellina necatrix* (Hart) Berl. Res. Dept. Fac. Text. Sericult. Shins Union, 2, 18-26.
- SANTRA S. et NANDI B., 1975.- Microstructural and microchemical studies of wood decay of *Caseronnia equisetifolia* by *Fomes durissimus*. Trans. Br. mycol. Soc., 65 (3), 507-509.
- SARKANEN K.V. et LUDWIG C.H., 1971.- Lignins occurrence, formation structure and reactions. New-York, London, Sidney et Toronto.
- SASS J.E., 1958.- Botanical microtechnique. Iowa state University Press, Ames. Iowa.
- SCHLOSSER E., 1980.- Preformed internal chemical defenses. In "Plant disease, vol. V : How plants defend themselves." Ed. by HORSFALL J.G. et COWLING E.B., Academic Press, New-York.
- SEQUEIRA L., 1983.- Mechanisms of induced resistance in plants. Ann. Rev. Microbiol., 37, 51-79.
- SHAIN L., 1967.- Resistance of sapwood in stems of loblolly pine to infection by *Fomes annosus*. Phytopathology, 57, 1034-1045.
- SHAIN L., 1971.- The response of sapwood of Norway Spruce to infection by *Fomes annosus*. Phytopathology, 61, 302-307.

- SHARPLES A., 1936.- Diseases and pests of the rubber tree.  
Mc Millan and C°, London, 480p.
- SHARPLES A., et GUNNERY H., 1933.- Callus formation in *Hibiscus rosa sinensis* L. and *Hevea brasiliensis* Müll Arg..  
Ann. Bot., 48, 827-838.
- SHELDRAKE A.R. et MOIR G.F.J., 1970.- A cellulase in Hevea latex.  
Physiol. Plant., 23, 266-277.
- SHERWOOD R.T. et VANCE C.P., 1976.- Histochemistry of papillae formed in reed canarygrass leaves in response to non infecting pathogenic fungi. Phytopathology, 56, 279-281.
- SHERWOOD R.T. et VANCE C.P., 1980.- Resistance to fungal penetration in Graminae. Phytopathology, 70 (4), 273-279.
- SHIGO A.L., 1975.- Compartmentalization of decay associated with *Fomes annosus* in trunks of *Pinus resinosa*.  
Phytopathology, 65, 1038-1039.
- SHIGO A.L., 1982 a. - A C.O.D.I.T. view of dutch elm disease.  
Phytopathology, 72, 265.
- SHIGO, A.L., 1982 b. - A C.O.D.I.T. view of tree cankers.  
Phytopathology, 72, 265.
- SHIGO A.L. et MARX M., 1977.- Compartmentalization of decay in trees, C.O.D.I.T. U.S. D.A., Inf. Bull., 405, 73pp.
- SHIGO A.L. et TIPPET J.T., 1981 a. - Compartmentalization of decay wood associated with *Armillaria mellea* in several tree species ; U.S. D.A., Inf. Bull., 488, 20pp.
- SHIGO A.L., et TIPPET J.T., 1981 b. - Compartmentalization of american elm tissues infected by *Ceratocystis ulmi*.  
Plant Dis., 65, 715-718.
- SHORTLE W.C., 1979.- Mechanisms of compartmentalization of decay in living trees. Phytopathology, 69, 1147-1151.
- SINGH P., 1980.- *Armillaria* root rot : artificial inoculation and development of the disease in greenhouse.  
Eur. J. For. Pathol., 10, 420-431.

- SOUTHORN W.A., 1968.- Latex flow studies. I. Electron microscopy of *Hevea brasiliensis* in the region of the tapping cut. J. Rubb. Res. Inst. Malaya, 20, 176-186.
- SPURR A.R., 1969.- A low viscosity epoxy resin embedding medium for electron microscopy. J. Ultrast. Res., 26, 31-43.
- THIERY J.P., 1967.- Mise en évidence des polysaccharides sur coupes fines en microscopie électronique. J. Microscopie, 6, 987-1018.
- TIPPETT J. et SHIGO A.L., 1980.- Barrier zone anatomy in red pine roots invaded by *Heterobasidion annosum*. Can. J. For. Res., 10, 224-232.
- TIPPETT J. et SHIGO A.L., 1981.- Barriers to decay in conifer roots. Eur. J. For. Pathol., 11 (1-2), 51-59.
- TIPPETT J., BOGLE A.L. et SHIGO A.L., 1982.- Response of balsam fir and hemlock roots to injuries. Eur. J. For. Pathol., 6-7, 357-364.
- TOPPAN A. et ROBY D., 1982.- Activité chitinasique de plantes de Melon infectées par *Colletotrichum lagenarium* ou traités par l'éthylène. Agronomie, 2 (9), 829-834.
- TOPPAN A., ROBY D., et ESQUERRE - TUGAYE M.T., 1982.- Cell surfaces plant microorganism interactions. III. *In vivo* regulation by ethylene of the accumulation of proline rich glycoproteins in the cell wall of diseases plants. Plant Physiol., 70, 82-86.
- TOUZE A., 1964.- L'antracnose du Melon. Etude de quelques manifestations physiologiques. Thèse Doct. d'Etat. Université Paul Sabatier, Toulouse.
- TOUZE A., et ROSSIGNOL M., 1977.- Lignification on the onset of premunition in muskmelon plants. In "Cell wall biochemistry related to specificity in host plant pathogen interactions. Ed. B. SOLHEIM et J. RAA, pp. 289-292, TROMSÖ, 485p.
- TRANCARD J., 1979.- Cellules à tannin et tubes laticifères dans le liber d'*Hevea brasiliensis* Müll. Arg. Rev. Cyto. Biol. Veg. Bot., 2, 1-6.

- VALLAVIELLE (de) C., 1980.- Contribution à l'étude des relations entre agrumes et *Phytophthora* spp. Thèse, 3<sup>e</sup> cycle. Université de Paris Sud, Paris.
- VAN DEN ENDE G. et LINSKENS H.F., 1974.- Cutinolytic enzymes in relation to pathogenesis. Ann. Rev. Phytopathology, 12, 247-258.
- VAN DER VALK P., MARCHANT R., et WESSELS J.G.H., 1977.- Ultrastructural localization of polysaccharides in the wall and septum of the Basidiomycete *Schizophyllum commune*. Exp. Mycology, 1, 69-82.
- VANCE C.P., KIRK T.K. et SHERWOOD R.T., 1980.- Lignification as a mechanism of disease resistance. Ann. Rev. Phytopathology, 18, 259-288.
- VARGHESE G., 1971.- Infection of *Hevea brasiliensis* by *Ustilina zonata* (Lev.) Sacc. J. Rubb. Res. Inst. Malaya, 23 (2), 157-163.
- VAUGHAN R.E., 1914.- A method for the differential staining of fungus and hosts cells. Ann. Mi. Bot. Gard., 1, 241-242.
- WARDROP A.B., 1971.- Occurrence and formation in plants. In "Lignins, occurrence, formation, structure and reaction". Ed by SARKANEN K.V. et LUDWIG C.H., Wiley Interscience, New-York, London, Sydney, Toronto.
- WESSELS J.G.H. et SIETSMA J.H., 1979.- Wall structure and growth in a *Schizophyllum commune*. In "Fungal walls and hyphal growth". Ed by BURNETT J.H. et TRINCI A.P.J., Cambridge University Press, Cambridge, London, New-York, Melbourne.
- WILCOX W., 1968.- Changes in wood microstructure through progressive stages of decay. US. For Sew. Res. Pop. FPL, 70, 1-46.
- WOOD R.K.S., 1978.- Enzymes produced by fungi and bacteria. Their rôle in pathogenicity. Ann. Phytopathology, 10 (2), 127-135.

## TABLE DES MATIERES

	Pages
INTRODUCTION GENERALE	
INTRODUCTION	2
QUELQUES RAPPELS SUR L'HÉVÉA ET SES PATHOGÈNES	5
A. L'HOTE	5
B. LA PATHOLOGIE DE L'HEVEA	5
1. Les organes aériens	6
2. Le système racinaire	6
3. Diagnose des pourridiés causés par <i>R. lignosus</i> et <i>P. noxius</i>	7
MATERIELS BIOLOGIQUES ET METHODES	9
A. LES MATERIELS BIOLOGIQUES	10
1. L'hôte	10
2. Les champignons parasites	10
B. REALISATION EXPERIMENTALE DES CONFRONTATIONS HOTE-PARASITE	10
1. <i>In vitro</i>	10
2. <i>In vivo</i>	11
a) Mode d'inoculation	11
b) Mesures et contrôle du taux d'humidité de la terre des bacs	12
c) Evaluation du niveau de l'attaque	14

	Pages
C. PREPARATION DU MATERIEL VEGETAL POUR LES OBSERVATIONS MICROSCOPIQUES	16
1. La microscopie photonique	16
2. La microscopie électronique à transmission	16
3. La microscopie électronique à balayage	20

### CHAPITRE I

MISE AU POINT ET DEFINITION DE PROTOCOLES EXPERIMENTAUX D'INFECTION EN CONDITIONS CONTRÔLEES DE JEUNES PLANTS D'HEVEA PAR <i>RIGIDOPORUS LIGNOSUS</i> ET <i>PELLINUS NOXIUS</i>	21
I. ESSAI AVEC <i>R. LIGNOSUS</i>	23
A. INOCULATIONS <i>IN VITRO</i>	23
B. INOCULATIONS <i>IN VIVO</i>	23
1. Choix du type d'inoculum	23
2. Incidence de l'âge de l'inoculum sur l'infection	24
3. Incidence de l'humidité du sol sur le pouvoir pathogène	25
II. ESSAI AVEC <i>P. NOXIUS</i>	27
A. INOCULATIONS <i>IN VITRO</i>	27
B. INOCULATIONS <i>IN VIVO</i>	28
1. Choix du type d'inoculum	28
2. Incidence de l'âge des bûchettes sur l'infection	28
DISCUSSION	29
CONCLUSION	30

B.	MODIFICATIONS CELLULAIRES AU COURS DE L'INFECTION	48
1.	Les altérations du cytoplasme des cellules parenchymateuses : cas des cellules associées aux laticifères	48
2.	La transformation du contenu des cellules à tannins	49
3.	Les perturbations au sein des laticifères	49
C.	DISCUSSION	51
IV.	COLONISATION ET DÉGRADATION DES TISSUS RACINAIRES LIGNIFIÉS	55
A.	LE PROCESSUS DE COLONISATION DU BOIS	56
B.	LA DEGRADATION DU XYLEME	57
1.	Les perturbations au niveau tissulaire	57
2.	Aspects ultrastructuraux de la dégradation du xylème, <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i>	57
C.	DISCUSSION	59
	LE PROCESSUS INFECTIEUX DE <i>PHELLINUS NOXIUS</i>	64
I.	PÉNÉTRATION ET DÉGRADATION DES TISSUS RACINAIRES NON LIGNIFIÉS	64
A.	LA PENETRATION DANS LES TISSUS RACINAIRES	64
B.	LA COLONISATION ET LA DEGRADATION DES TISSUS	65
1.	Développement du mycélium dans les tissus	65
2.	Dégradation des tissus colonisés	65
C.	DISCUSSION	66
II.	COLONISATION ET DÉGRADATION DES TISSUS RACINAIRES LIGNIFIÉS	66
A.	OBSERVATIONS <i>IN VIVO</i>	66
B.	OBSERVATIONS <i>IN VITRO</i>	67
C.	DISCUSSION	68
	DISCUSSION GÉNÉRALE	70

CHAPITRE III

Pages

ASPECTS HISTO-CYTOLOGIQUES DE QUELQUES REACTIONS DE DEFENSE DE L'HEVEA A L'AGRESSION PARASITAIRE	75
INTRODUCTION	76
RÉSULTATS	78
I. LES RÉACTIONS PRÉCOCES	78
A. HYPERPLASIE ET HYPERTROPHIE CELLULAIRES	78
B. STIMULATION DU POOL PHENOLIQUE	78
II. LES RÉACTIONS POST-INITIALES	79
A. AU NIVEAU HISTOLOGIQUE	79
B. AU NIVEAU CELLULAIRE	79
C. AU NIVEAU CYTOCHIMIQUE	80
III. LES RÉACTIONS INTERVENANT AU COURS DE LA COLONISATION DES TISSUS	80
A. LE LIEGE	80
B. LE PHLOEME	81
C. LE XYLEME	81
1. Au niveau histologique	81
2. Au niveau cellulaire	82
IV. LES RÉACTIONS TARDIVES	82
A. ELABORATION DES FOYERS CELLULAIRES A CARACTERE EMBRYONNAIRE	82
B. LES TISSUS LIBERO-LIGNEUX NEOFORMES	83
DISCUSSION	84
CONCLUSION	94
CONCLUSION GENERALE	95
BIBLIOGRAPHIE	100

ABRÉVIATIONS UTILISÉES

CMC	Carboxy-Methyl Cellulase
GERME	Groupe d'Etude et de Recherche en Microscopie Electronique
HV	Humidité volumique, exprimée en %.
IRCA	Institut de Recherche sur le Caoutchouc.
LM	Lamelle moyenne.
MEB	Microscope électronique à balayage.
MET	Microscope électronique à transmission.
MP	Microscope photonique.
$\overline{NS}$	Note sanitaire moyenne.
P.A.T.Ag	Technique à l'acide périodique - thiocarbohydrazide - protéinate d'Argent.
P <sub>I</sub>	Paroi primaire.
P <sub>II</sub>	Paroi secondaire.
SAPH	Société Africaine des Plantations d'Hévéa.
SOGB	Société des Caoutchoucs de Grand-Béréby.

PLANCHES PHOTOGRAPHIQUES

PLANCHE I

Glutaraldéhyde-tétroxyde d'osmium ; acétate d'uranyle-citrate de plomb (1 à 7) ; test de Thiéry (4)

ULTRASTRUCTURE DES HYPHES DE *R. LIGNOSUS*  
Composantes cellulaires d'une hyphe en activité

- 1 et 2 : noyaux, délimités par une membrane double (flèches), et possédant un nucléole dense (nu) ;  
1 : x 22500.  
2 : x 22500.
- 3 : le réticulum endoplasmique des hyphes est garni de particules osmiophiles, les ribosomes (flèches) ;  
x 30000.
- 4 : au niveau de l'apex, les mitochondries (flèches) sont abondantes et volumineuses, (test de Thiéry) ;  
x 60000.
- 5 : appareil de Golgi (G), composé de vésicules non organisées en dictyosomes ; x 80000.
- 6 et 7 : formations associées au plasmalemme : les lomasomes (6) (L) et les plasmalémmasomes (7) différenciés à partir de la membrane plasmique (mp) ;  
6 : x 22500.  
7 : x 37500.

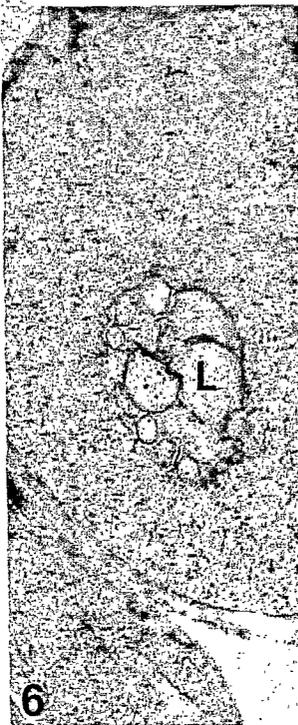
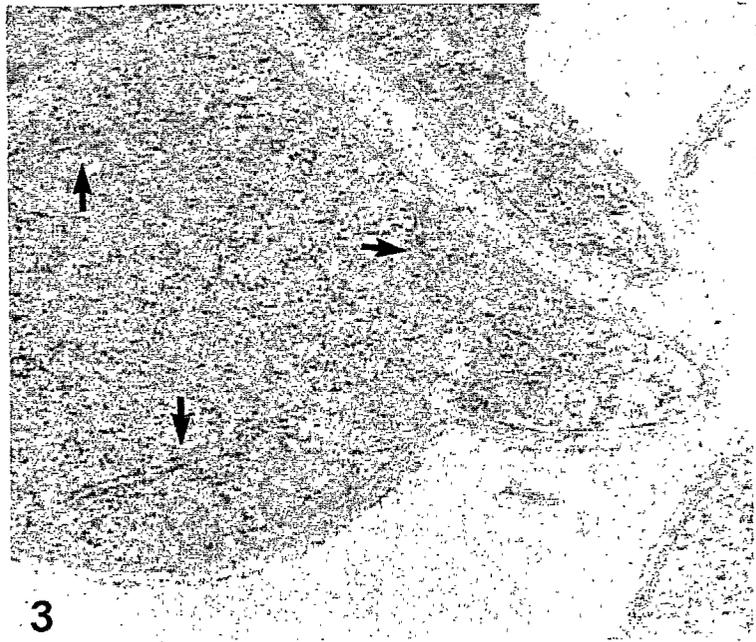
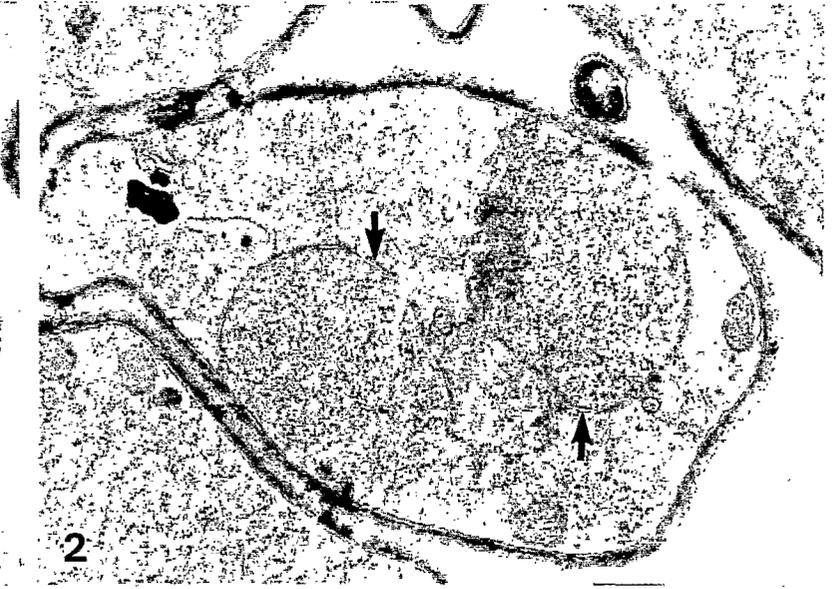


PLANCHE II

Glutaraldéhyde-tétroxyde d'osmium ; acétate d'uranyle-citrate de plomb (2 à 6) ; test de Thiéry (1) ; métallisation à l'or (7).

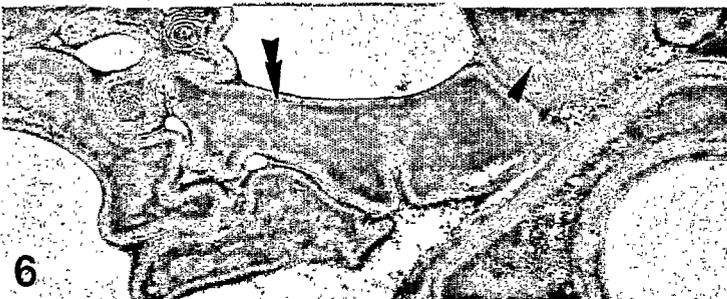
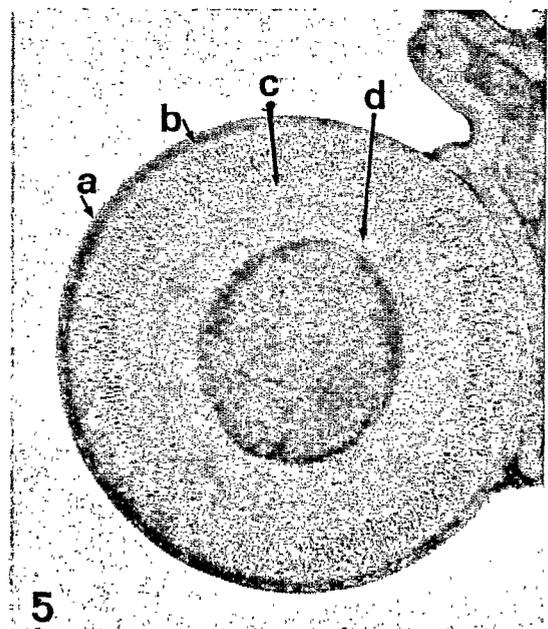
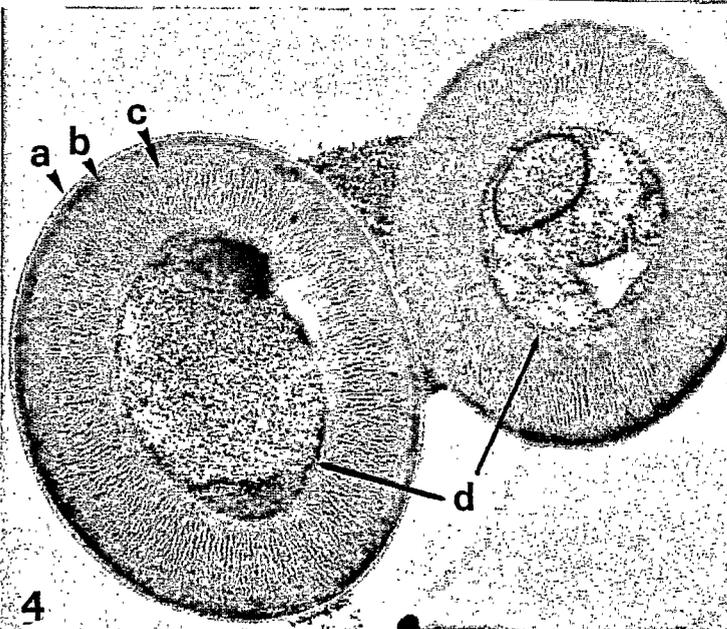
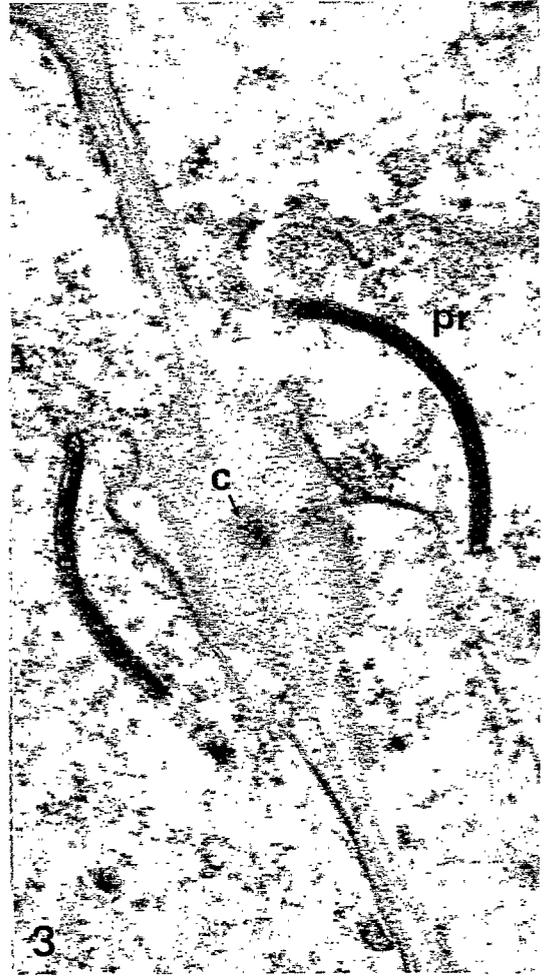
ULTRASTRUCTURE DES HYPHES DE *R. LIGNOSUS*

Composantes cellulaires d'une hyphe en activité

- 1 : petites vésicules distribuées dans les régions périplasmiques (flèches) et dont le contenu est riche en polysaccharides (Test de Thiéry) (p : paroi) ; x 60000.
- 2 : appareil vacuolaire (v) d'une hyphe parasite, renfermant des amas très denses aux électrons (flèches) ; x 20000.
- 3 : appareil septal : dolipore-parenthésome typique des Basidiomycètes ; (c : canal ; pr : parenthésomes) ; x 60000.

Organisation de la paroi

- 4 et 5 : filaments à paroi épaisse constituée de 4 fractions (a,b,c, et d) dont la plus épaisse (c) est réticulée.  
4 : x 30000.  
5 : x 30000.
- 6 : coupe dans un rhizomorphe, au contact d'une racine, montrant des hyphes à paroi épaisse (flèches) et des hyphes à paroi plus fine (double flèches) ; x 15000.
- 7 : aspect au microscope électronique à balayage, de quelques hyphes à paroi épaisse (double flèches) et à paroi fine (flèche) ; x 15000.



### PLANCHE III

Glutaraldéhyde-tétroxyde d'osmium ; acétate d'uranyle-citrate de plomb (1-2), test de Thiéry (3) ; métallisation à l'or (5) ;

Formol-ethanol-acide acétique ; bleu de picroaniline-safranine (4)

#### ULTRASTRUCTURE DES HYPHES DE *R. LIGNOSUS*

##### Organisation de la paroi

1 et 2 : hyphe parasite à paroi fine, (L:lomasome ; mi : mitochondrie ; N : noyau ; p : paroi ; pl: plasmalémasome ; v : vacuole) ;

1 : x 20000.

2 : x 20000.

3 : hyphe parasite, test des polysaccharides : remarquez la fine granulation des parois et des structures membranaires (flèches); x 60000.

#### PENETRATION DE LA RACINE PAR *R. LIGNOSUS*

4-4' : MP : pression (flèche) exercée par un rhizomorphe (r) au niveau d'une déchirure tissulaire, traduisant une action mécanique de la part du champignon au cours de la pénétration ; x 530.

5 : microscope électronique à balayage ; le tissu au contact du rhizomorphe (r), le liège en l'occurrence, a un aspect très dégradé (flèches) ; x 1920.

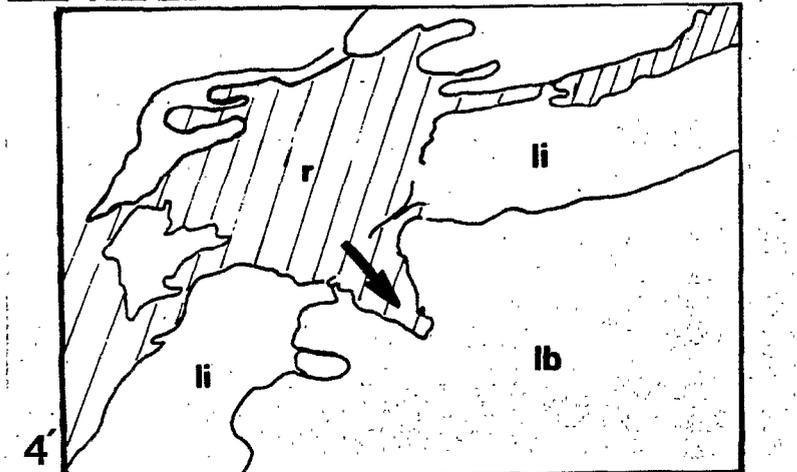
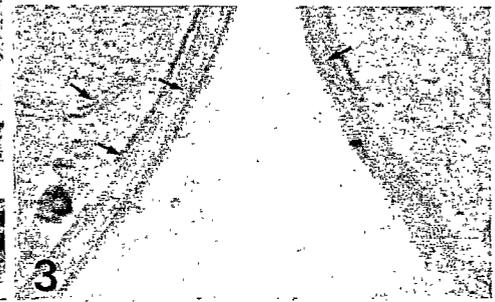
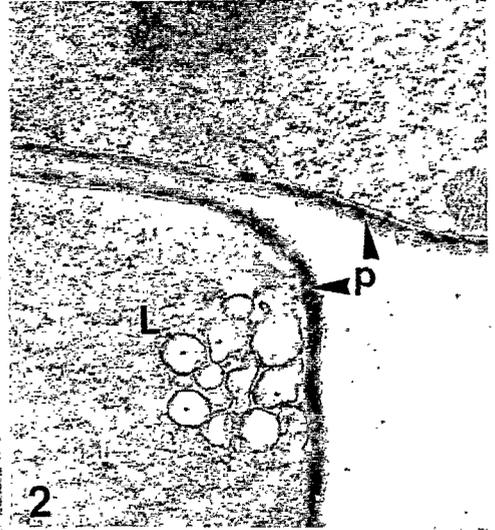
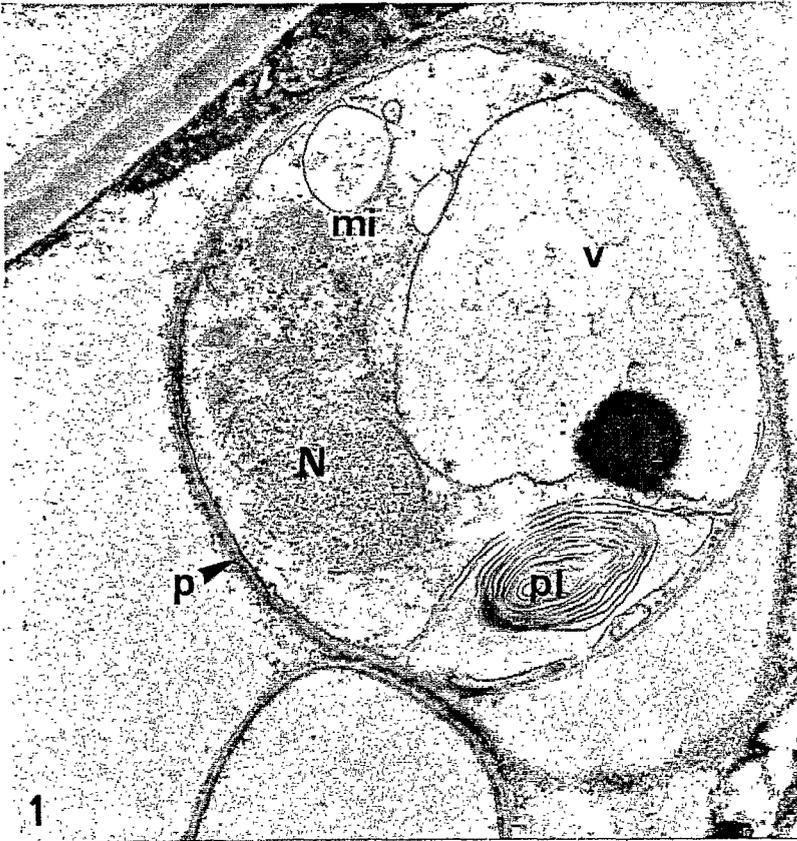
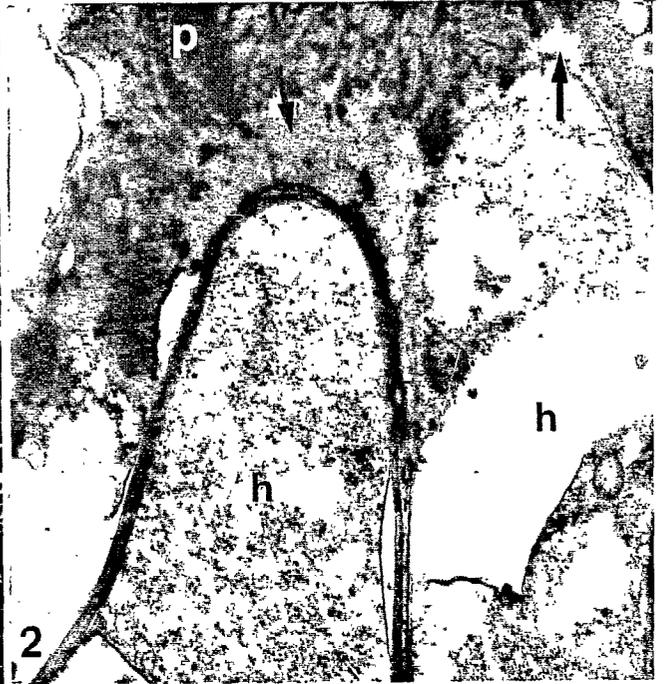


PLANCHE IV

Formol-éthanol-acide acétique, bleu de picro-aniline-safranine (1).  
Glutaraldéhyde-tétraxyle d'osmium ; acétate d'uranyle-citrate de  
plomb (2 à 4).

PENETRATION DE LA RACINE PAR *R. LIGNOSUS*

- 1 : MP : déchirure (flèche) provoquée par la pression du rhizomorphe (r) sur les tissus corticaux ; x 925.
- 2 : présence d'une zone granuleuse (flèches) au voisinage des hyphes (h) pénétrant dans les cellules ; les parois (p) apparaissent dégradées au contact des filaments, traduisant l'action dégradante du champignon ; x 15000.
- 3 : la dégradation des parois des cellules hôtes (p) permet aux hyphes (h) d'occuper rapidement la lumière des cellules ; x 8500.
- 4 : différenciation à partir d'un article d'un filament mycélien extraracinaire (h), d'une structure analogue à celle d'un haustorium (ha), capable de dégrader les parois (p) et d'envahir les cellules ; x 12000.



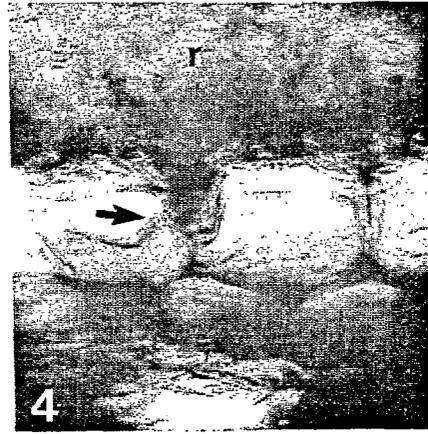
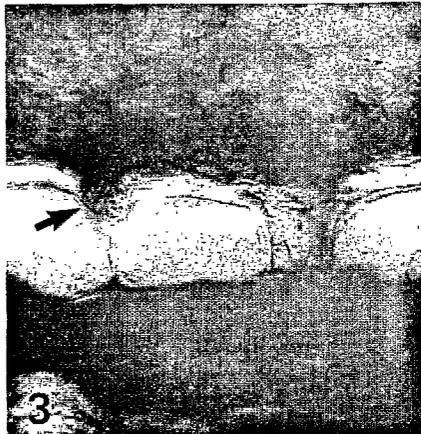
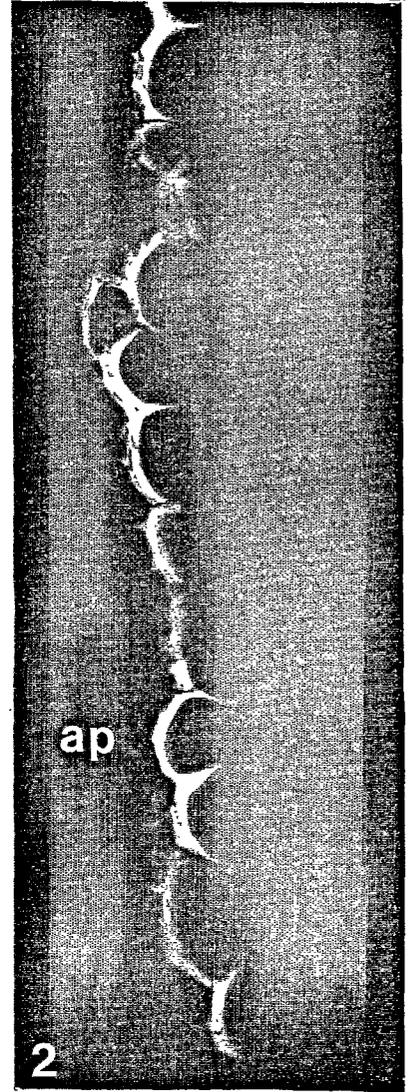
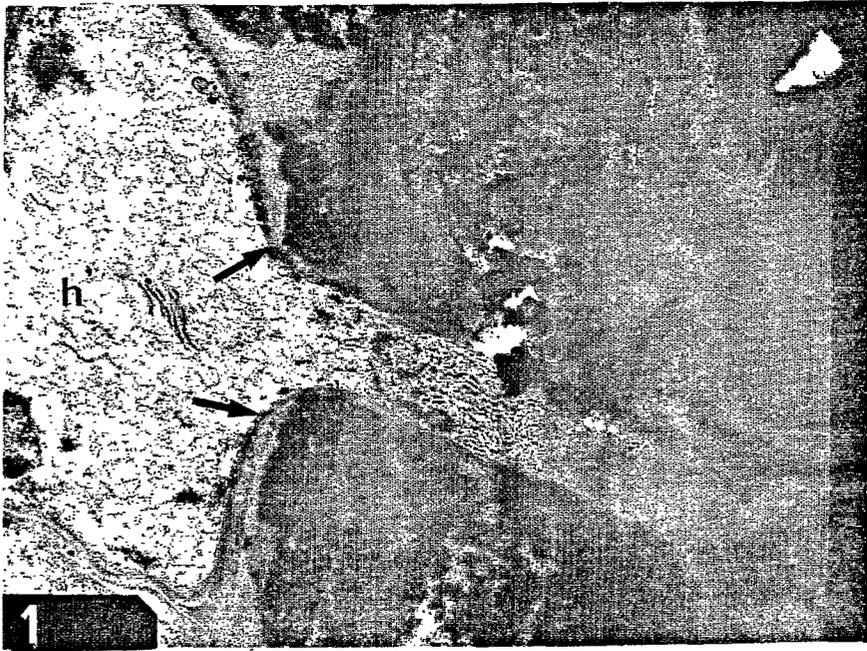
## PLANCHE V

Glutaraldéhyde-tétroxyde d'osmium ; acétate d'uranyle-citrate de plomb (1,5 et 6)

Coupe non fixée ; bleu coton (3,4) ; bleu d'aniline, observation au microscope à fluorescence (2)

### PENETRATION DE LA RACINE PAR *R. LIGNOSUS*

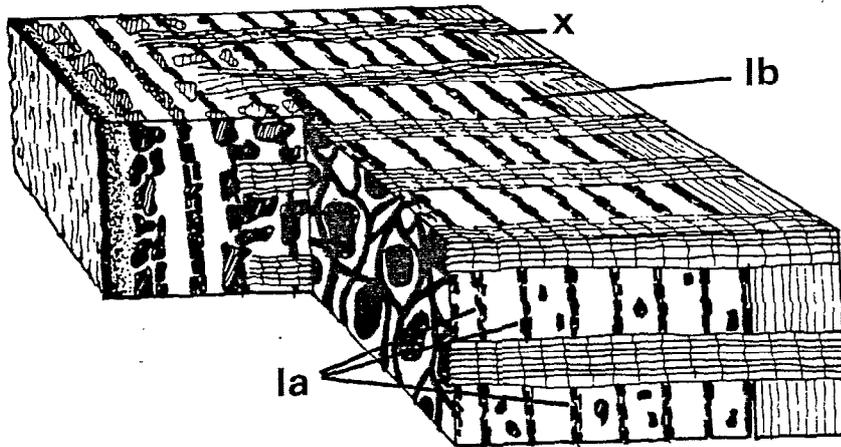
- 1 : la paroi de l'haustorium est différenciée à partir de la fraction interne (flèche) de la paroi de l'article de l'hyphe extraracinaire (h) ; x 18500.
- 2 : MP à fluorescence ; la pénétration individuelle des hyphes dans l'assise péridermique (ap) provoque une perturbation des parois cellulaires traduite par une diminution de leur fluorescence ; x 1300.
- 3 et 4 : MP:pénétration, par les hyphes, de l'assise péridermique au niveau des espaces intercellulaires (flèches) (r : rhizomorphe).
  - 3 : x 1300.
  - 4 : x 1300.
- 5 : pénétration d'hyphes au niveau des espaces intercellulaires de l'assise péridermique. Un filament (h) a différencié un haustorium (ha) dont les parois sont plus épaisses que celle de celui décrit précédemment. Au contact du mycélium les parois sont dégradées (flèches) ; x 7500.
- 6 : importante altération des espaces intercellulaires de l'assise péridermique. La paroi, fortement digérée, a l'aspect d'une dentelle ; x 15000. (h : hyphe).



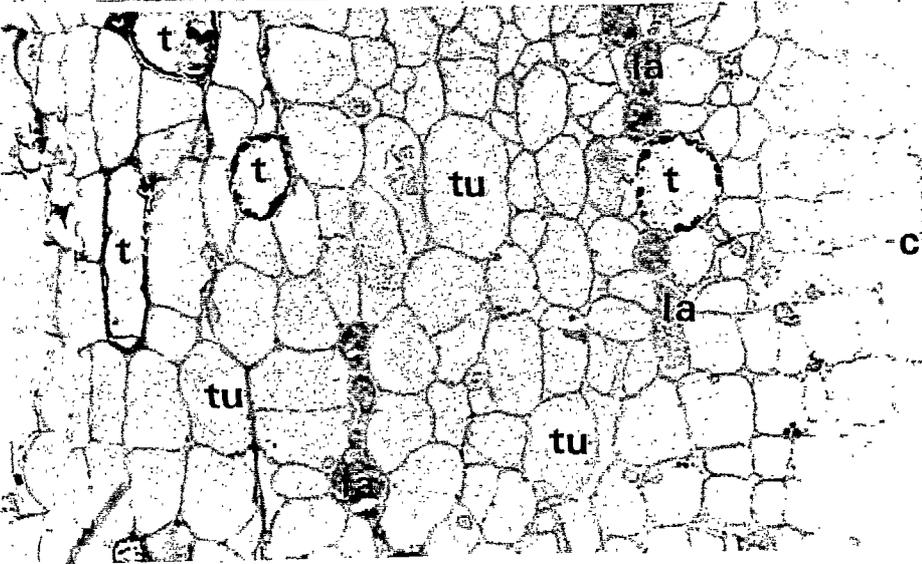
## PLANCHE VI

### COLONISATION ET DEGRADATION DES TISSUS RACINAIRES NON LIGNIFIES

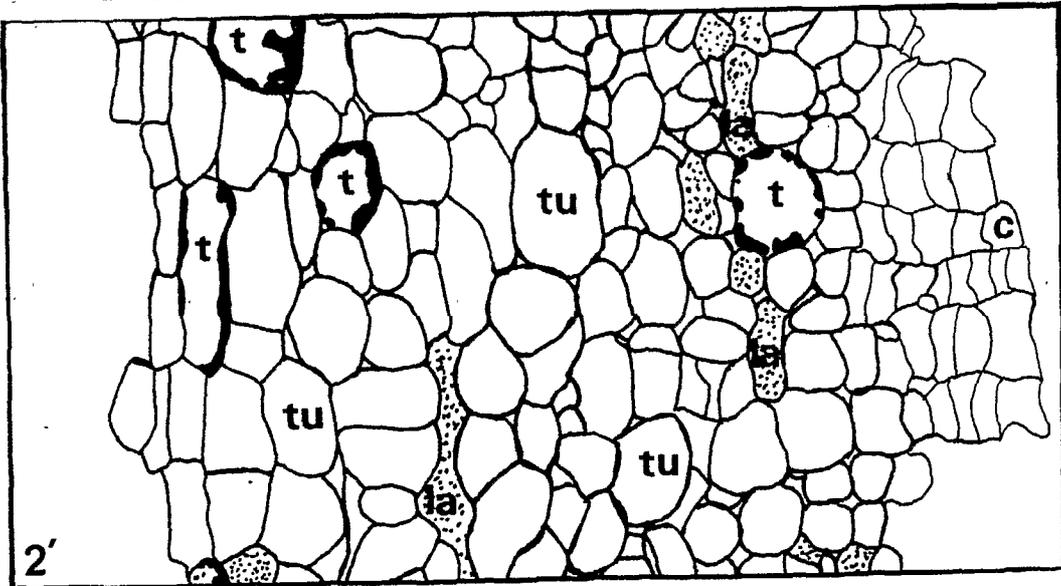
- 1 : organisation du phloème secondaire (lb). Les laticifères (la) sont disposés en manteaux concentriques. (D'après De FAÿ, 1981). (x : xylème).
  
- 2 : schéma d'une coupe transversale du liber d'une racine d'Hévéa âgé de 6 semaines. A ce stade, les laticifères (la) sont encore peu nombreux. Les cellules à tannins (t) leurs sont souvent associées. L'ensemble de toutes ces cellules, y compris les tubes criblés (tu) sont différenciées à partir du cambium (c).



1



2



2'

## PLANCHE VII

Glutaraldéhyde-tétréoxyde d'osmium ; acétate d'uranyle-citrate de plomb (1 à 3):

### COLONISATION ET DEGRADATION DES TISSUS RACINAIRES NON LIGNIFIES

- 1 et 1' : perforation de la paroi d'une cellule du parenchyme cortical ; la lamelle moyenne (lm) et la paroi cellulosique (p) sont dégradées au contact du parasite (flèche). On remarque une désorganisation de la structure fibrillaire (h : hyphe); x 20000.
- 2 : début de perforation de la paroi d'une cellule du parenchyme cortical. Une zone granuleuse (flèche) est visible au niveau de l'interface hyphe (h) - paroi (p), traduisant un début de dégradation ; x 16000.
- 3 : disparition totale de la lamelle moyenne (flèche) entre deux cellules du parenchyme cortical ; x 20000.

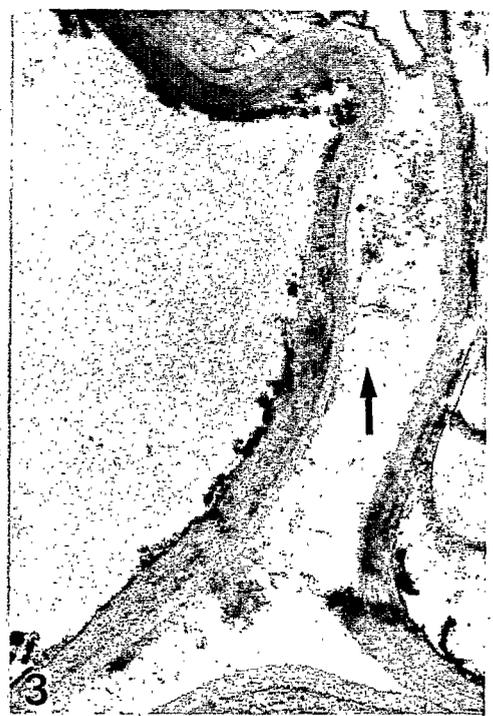
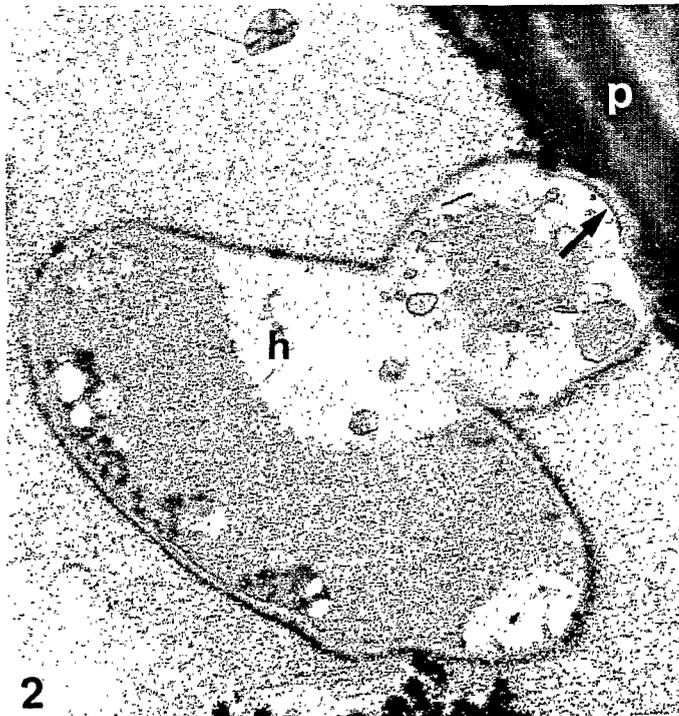
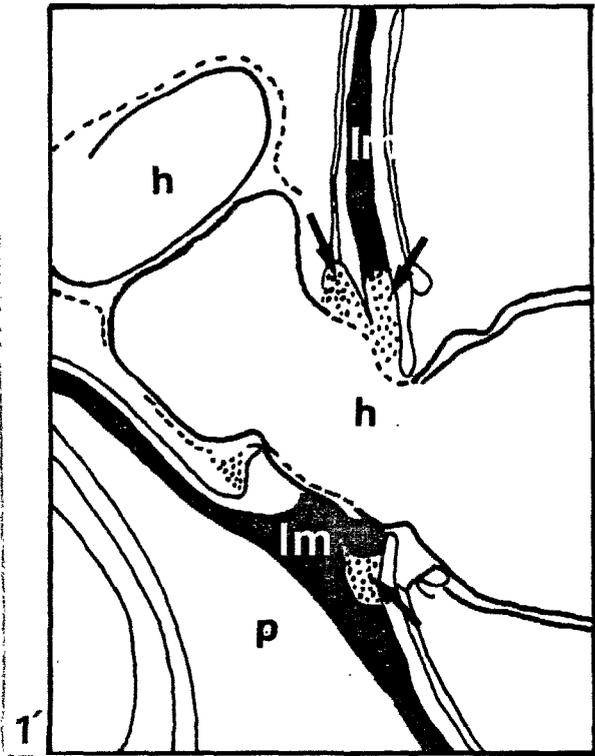
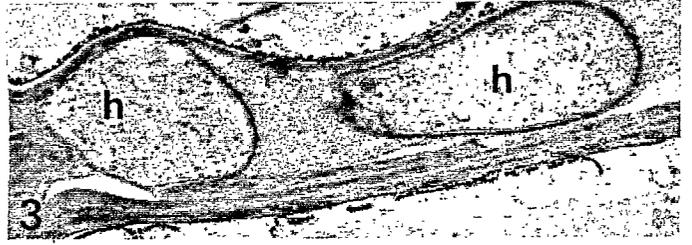
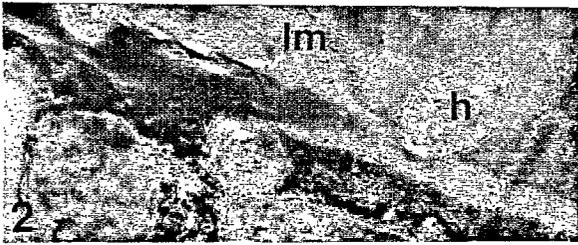


PLANCHE VIII

Glutaraldéhyde-tétroxyde d'osmium ; acétate d'uranyle-citrate de plomb (1 à 5)

COLONISATION ET DEGRADATION DES TISSUS RACINAIRES NON LIGNIFIES

- 1 : phase intermédiaire de la dégradation des parois (p) qui prend un aspect alvéolaire (flèches) à distance et au contact des hyphes (h) ; x 12000.
- 2 et 3 : localisation intercellulaire des hyphes (h) dans la lamelle moyenne (lm) ;  
2 : x 6000.  
3 : x 9000.
- 4 : au cours de la perforation des parois cellulaires, un hyphe (h) différencie une ramification (flèche) qui s'insère au niveau de la lamelle moyenne (lm) déjà très altérée ; x 7500.
- 5 : perforation des parois ; à l'action enzymatique (grandes flèches) s'associe quelquefois une action mécanique visualisée, ici, par la pression qu'exerce une hyphe (h) sur les fibres de la paroi (petites flèches) ; x 25000.

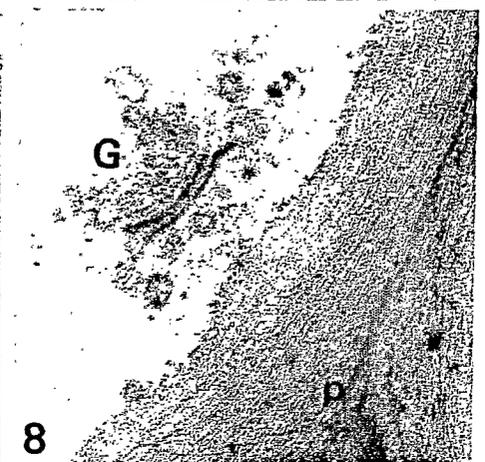
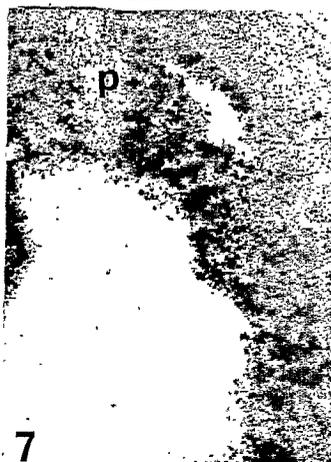
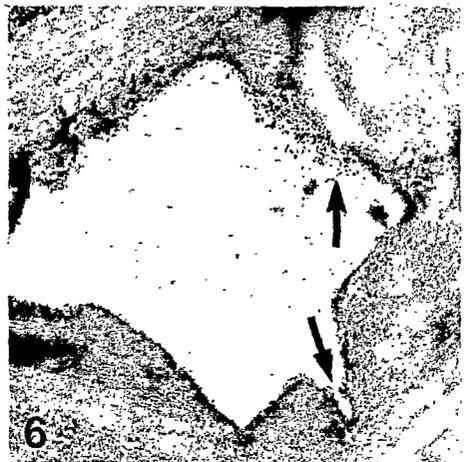
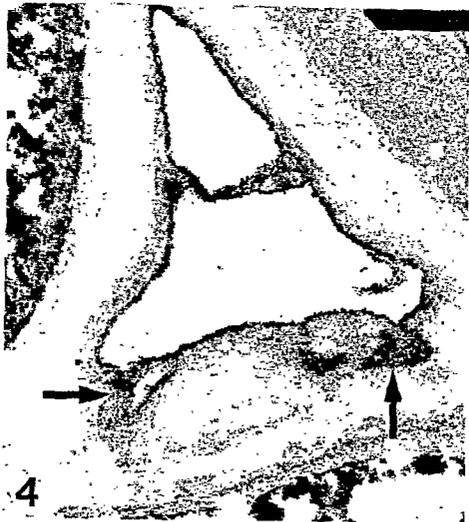
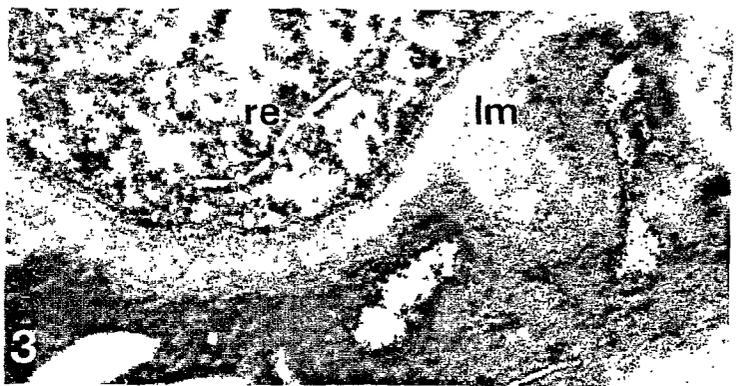


## PLANCHE IX

Glutaraldéhyde-tétroxyde d'osmium ; acétate d'uranyle-citrate de plomb (1 à 8)

### COLONISATION ET DEGRADATION DES TISSUS RACINAIRES NON LIGNIFIES

- 1 : la pression exercée par le filament en croissance (h) pour perforer la paroi, provoque une légère invagination de cette dernière (petite flèche) dans le sens de progression de l'hyphe (grosse flèche). On distingue également une action corrosive simultanée (double flèche) ; x 30000.
- 2 : l'altération des parois des cellules du liber débute par une augmentation de l'osmiophilie de la lamelle moyenne (lm); (tc : tube criblée) ; x 9000.
- 3 : après augmentation de l'osmiophilie, la lamelle moyenne (lm) se perfore ; (re : réticulum endoplasmique) ; x 20000.
- 4, 5 et 6 : progression de la dégradation de la paroi des cellules du liber vers les fractions cellulosiques (flèches) ;  
4 : x 15000.  
5 : x 15000.  
6 : x 15000.
- 7 et 8 : démantèlement de l'architecture fibrillaire des parois des cellules (p) du phloème (7). Le cliché 8 montre l'organisation des fibres d'une paroi non altérée ; (G : appareil de Golgi) ; 7 : x 40000.  
8 : x 45000.



## PLANCHE X

Glutaraldéhyde-tétroxyde d'osmium ; acétate d'uranyle-citrate de plomb (1 à 7)

### COLONISATION ET DEGRADATION DES TISSUS RACINAIRES NON LIGNIFIES

- 1 : disparition quasi-totale de la lamelle moyenne, favorisant, à terme, la dislocation des cellules (tc : tube criblé) ; x 12000.
- 2 : altération des parois subérifiées du liège ; augmentation de l'osmiophilie (flèche) sans contact direct avec les hyphes (h) ; x 12000.
- 3 : altération des parois subérifiées du liège ; augmentation de l'osmiophilie (flèche) au contact d'une hyphe (h) ; x 10000.
- 4 : disparition de la structure fibrillaire des parois subérifiées des jeunes cellules du liège ; x 20000.
- 5 : envahissement des cellules du liège par les hyphes mycéliennes ; (p : parois cellulaires subérifiées) ; x 7500.
- 6 : hyphe (h) en position intrapariétale dans les cellules du liège. Remarquez l'altération circum-fongique (flèche) de la paroi (p) ; x 16000.
- 7 : perforation d'une paroi subérifiée (p) par un filament mycélien (h) ; x 19000.

Les clichés 2 à 7 traduisent l'aptitude de *R. lignosus* à dégrader les parois subérifiées, vraisemblablement par l'intermédiaire d'estérases extracellulaires, dosées *in vitro*.

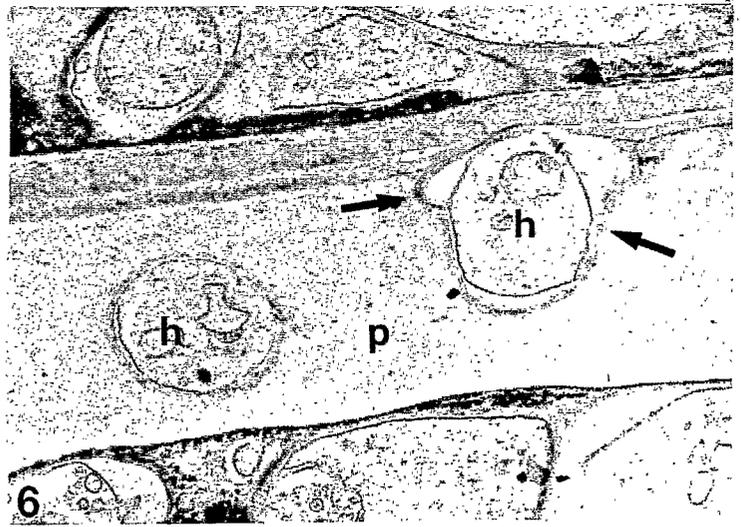
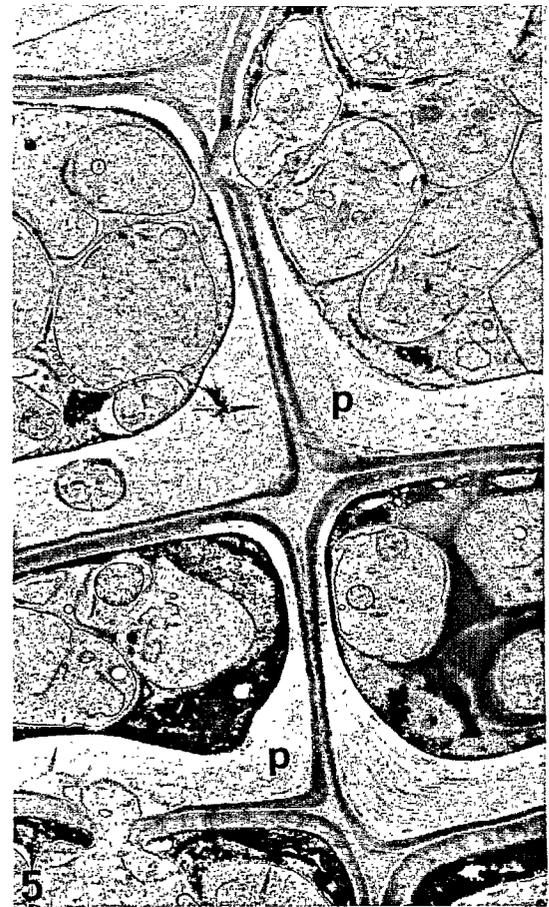
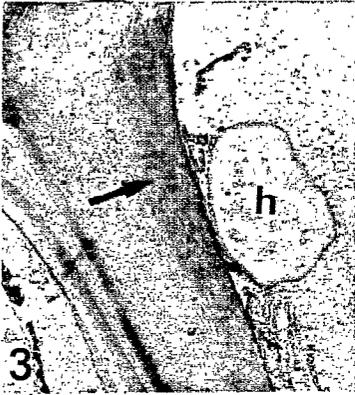
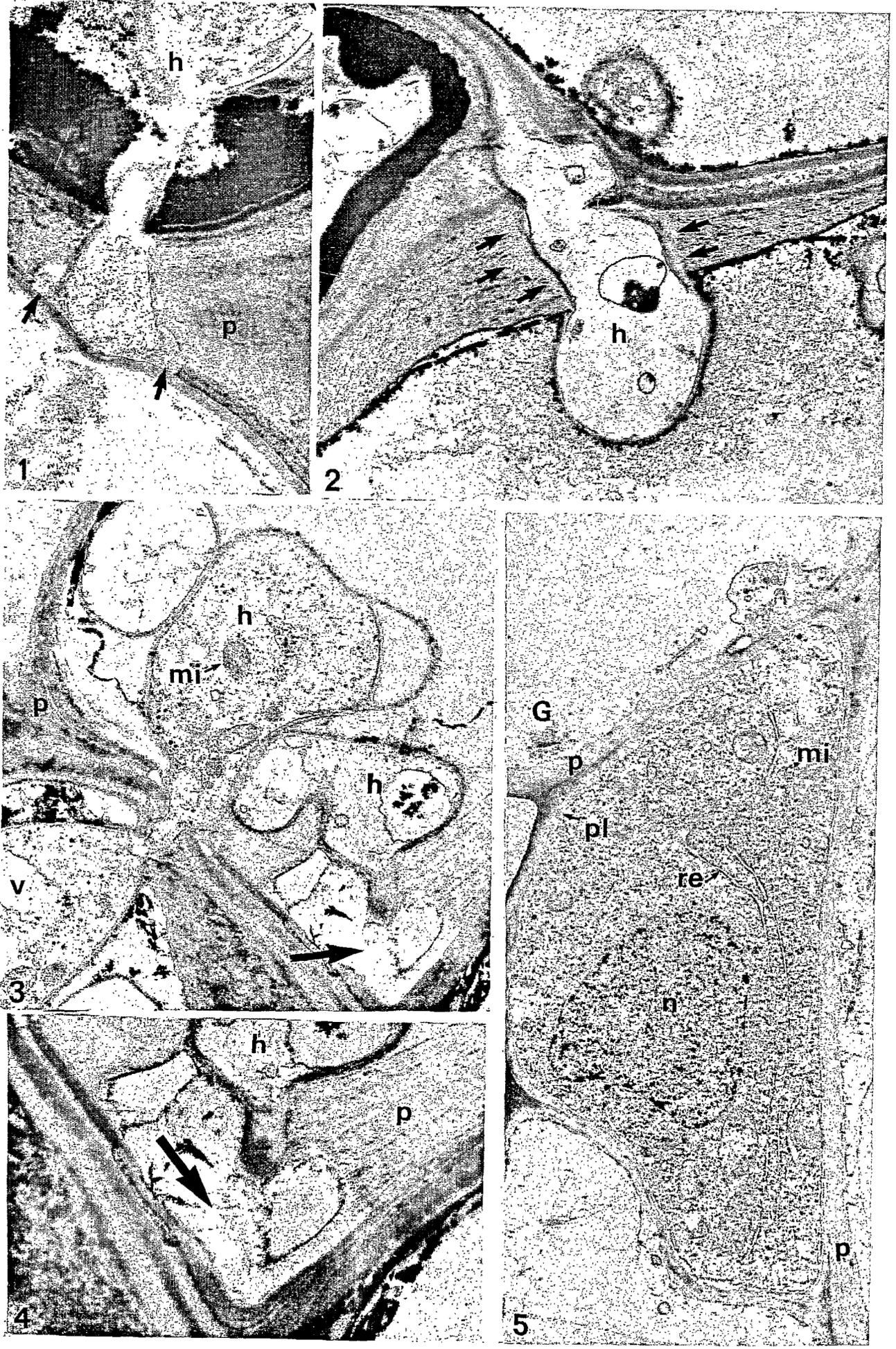


PLANCHE XI

Glutaraldéhyde-tétroxyde d'osmium ; acétate d'uranyle-citrate de plomb (1 à 5)

COLONISATION ET DEGRADATION DES TISSUS RACINAIRES NON LIGNIFIES

- 1 : digestion ponctuelle de la paroi subérifiée (flèche) autour des hyphes mycéliennes (h : hyphes ; p : paroi) ; x 19000.
- 2 : désorganisation de la structure fibreuse des parois subérifiées (flèches) au contact d'un filament mycélien (h) ayant perforé la paroi ; x 16000.
- 3 : perforation d'une paroi faiblement subérifiée ; remarquez la constriction de l'hyphe (h) au passage de la paroi (p). A droite, une partie de la paroi subérifiée a totalement disparu (flèche) ; (mi : mitochondrie ; v : vacuole) ; x 10000.
- 4 : agrandissement de la photographie 3 ; digestion complète d'une fraction de la paroi subérifiée (flèche) ; x 25000.
- 5 : Cellule parenchymateuse du liber sain. Le cytoplasme dense est abondamment garni d'organites ; (G : appareil de Golgi ; mi : mitochondrie ; n : noyau ; p : paroi ; pl : plasmalemma ; re : réticulum endoplasmique) ; x 10000.

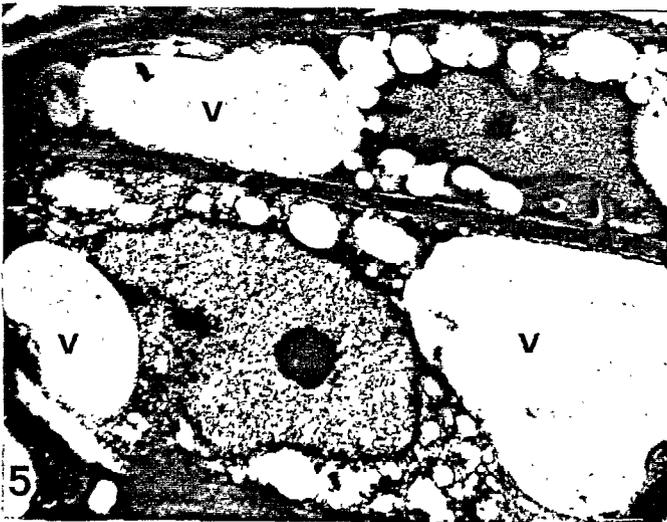
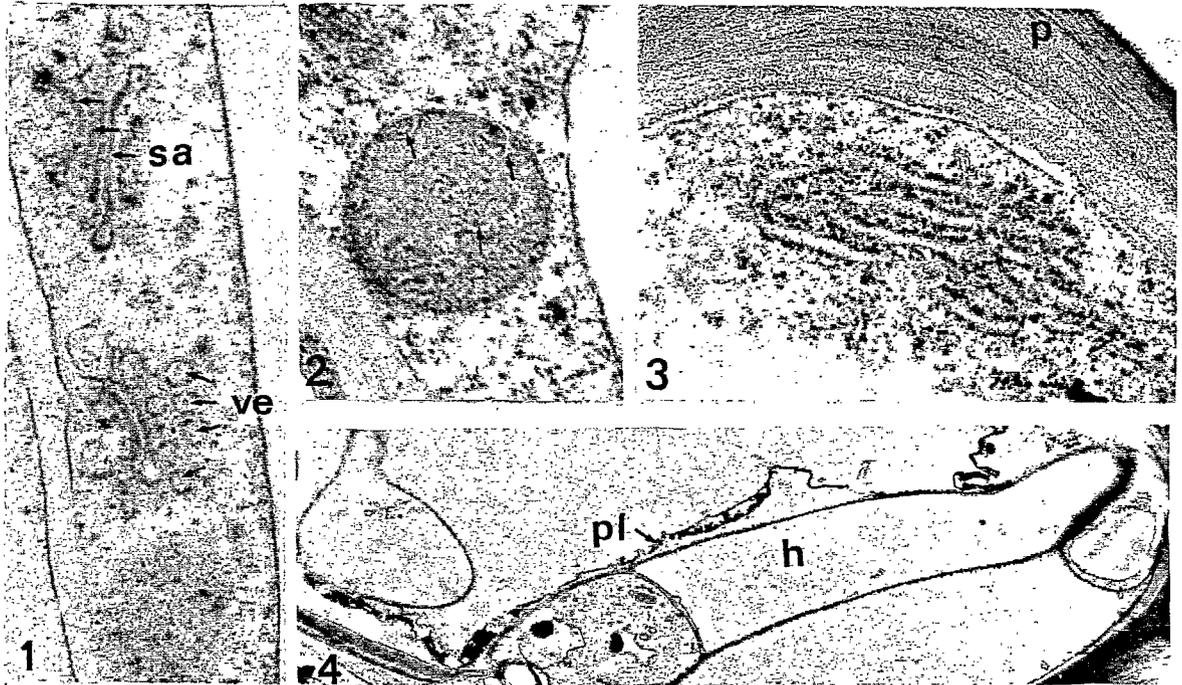


## PLANCHE XII

Glutaraldéhyde-tétroxyde d'osmium ; acétate d'uranyle-citrate de plomb (1 à 8)

### COLONISATION ET DEGRADATION DES TISSUS RACINAIRES NON LIGNIFIES

- 1 : appareil de Golgi d'une jeune cellule parenchymateuse saine ; (sa : sacules ; ve : vésicules) ; x 50000.
- 2 : mitochondrie d'une cellule parenchymateuse saine. L'observation des crêtes mitochondriales est aisée (flèches) ; x 45000.
- 3 : réticulum endoplasmique garni de ribosomes (p : paroi) ; x 45000.
- 4 : le plasmalemma (pl), très osmiophile cède sous la pression d'une hyphe (h) qui se déplace dans l'espace périplasmique ; x 6000.
- 5 : vacuolisation du cytoplasme, qui disparaît au profit de grandes vacuoles (v) ; x 4500.
- 6 : quelques travées cytoplasmiques (flèches) contenant des organites, sont concentrées autour du noyau (n) ; (nu : nucléole) ; x 7500.
- 7 : liber sain ; dans une cellule tannifère, les tannins (t), produits par le système vacuolaire (v), sont distribués à la périphérie de la cellule ; (la : laticifère) ; x 15000.
- 8 : durant l'infection le contenu des cellules à tannins se modifie ; on constate une augmentation des précipités de tannins dans la vacuole (x 8000).



### PLANCHE XIII

Glutaraldéhyde-tétroxyde d'osmium ; acétate d'uranyle-citrate de plomb (1 à 8)

#### COLONISATION ET DEGRADATION DES TISSUS RACINAIRES NON LIGNIFIES

- 1 : au cours de l'infection, la production de tannins (t) est telle qu'ils occupent l'ensemble de la vacuole ; (flèche : paroi altérée ; (tc : tube criblé) ; x 6000.
- 2 : cellule laticifère saine contenant des lutoïdes (l) et des particules de caoutchouc (cc) ; x 9000.
- 3 : particules de caoutchouc ; x 25000.
- 4 : lutoïde à l'état jeune (l), contenant des protéines fibrillaires (flèches) observées en coupe transversale et en coupe longitudinale ; x 20000.
- 5 : noyau (n) d'un laticifère ; notez la présence de microtubules (mt) au voisinage de la membrane nucléaire (mn) ; (nu : nucléole) ; x 15000.
- 6 : espace périplasmique d'un laticifère contenant de nombreuses fibres (flèches) en relation étroite avec la paroi (p) ; x 30000.
- 7 : début de coagulation du latex ; fusion (flèche) de deux particules de caoutchouc (cc) qui forment un microcoagulum ; x 30000.
- 8 : accumulation de microcoagula (mc) dans le cytoplasme d'un laticifère ; x 50000.

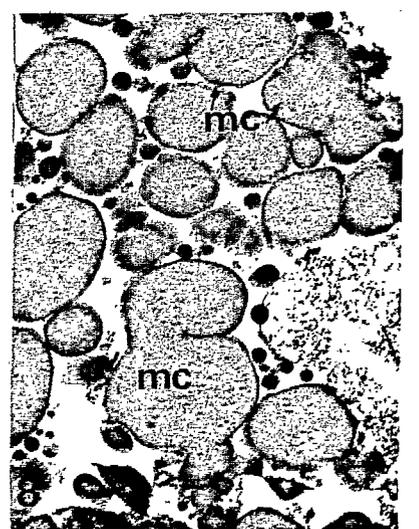
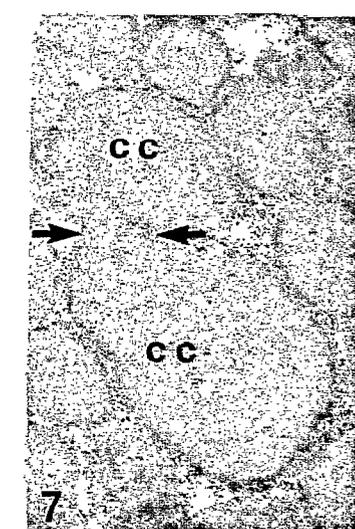
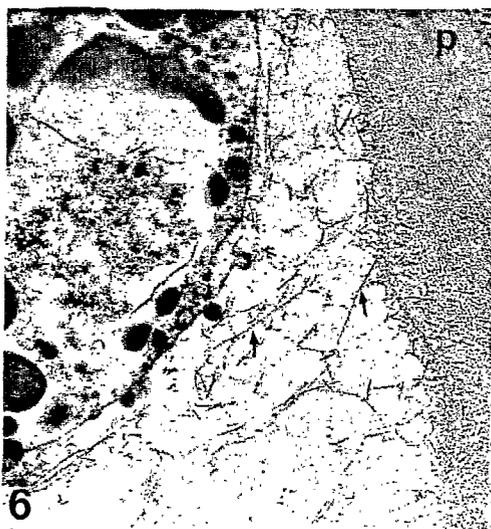
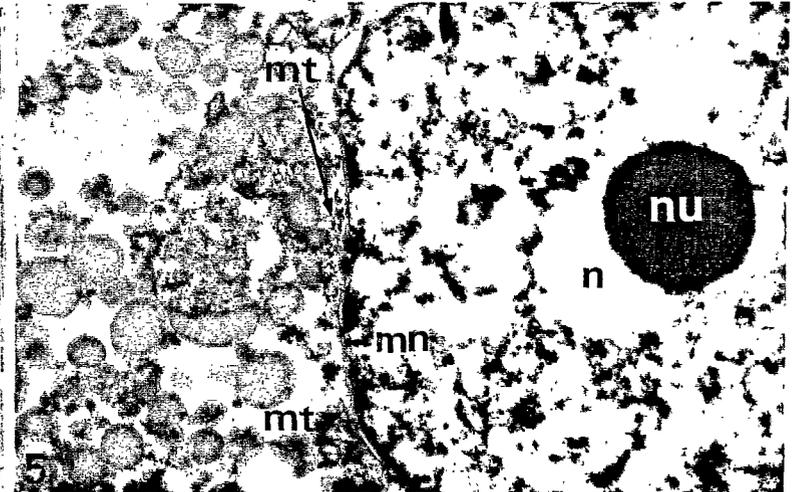
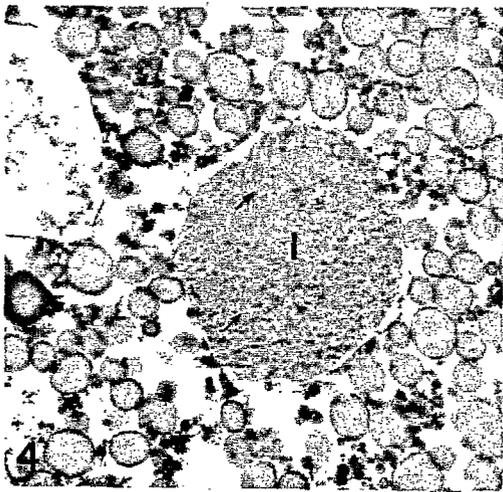
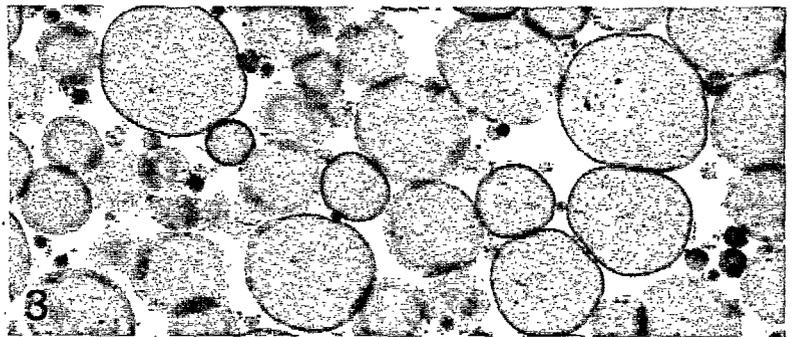
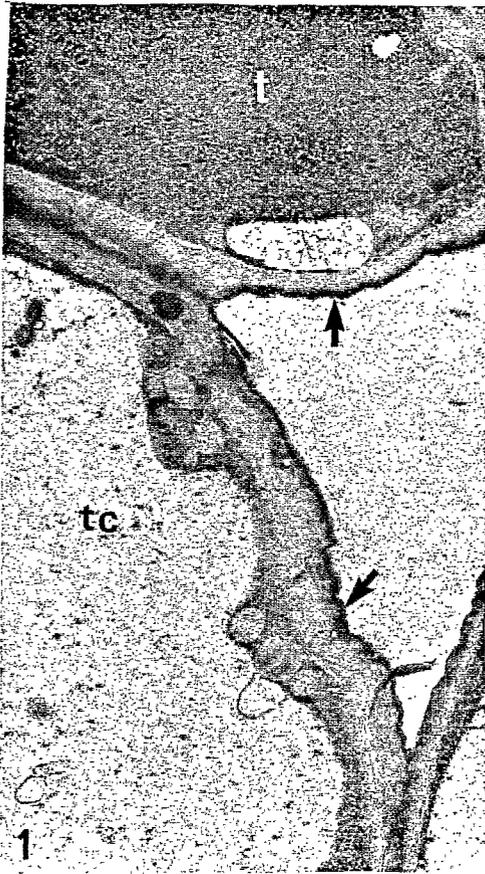


PLANCHE XIV

Glutaraldéhyde-tétroxyde d'osmium ; acétate d'uranyle-citrate de plomb (1-2).

COLONISATION ET DEGRADATION DES TISSUS RACINAIRES NON LIGNIFIES

- 1 : abondance particulière de microcoagula (flèche) autour des systèmes vacuolaires (v) ; x 20000.
- 2 et 2' : localisation des microcoagula (mc) autour d'un lutoïde (1) dont la membrane est rompue en plusieurs endroits (flèches) (p : protéines fibrillaires en coupe longitudinale ; p' : protéines fibrillaires en coupe transversale) ; x 20000.

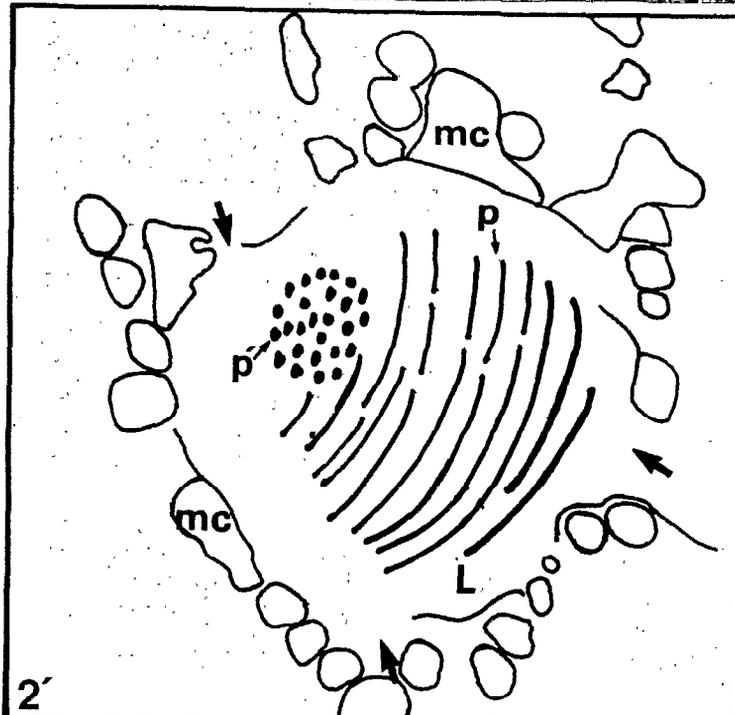
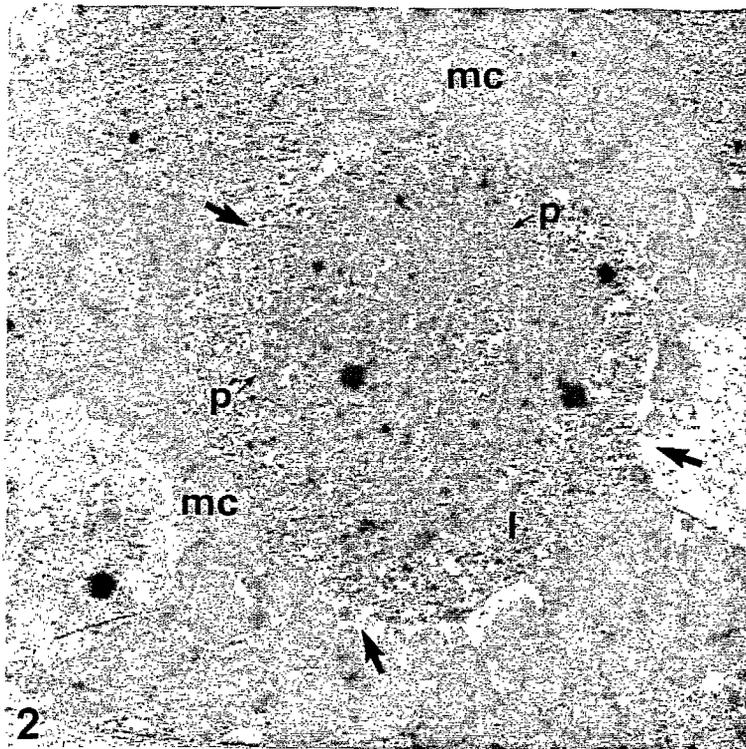
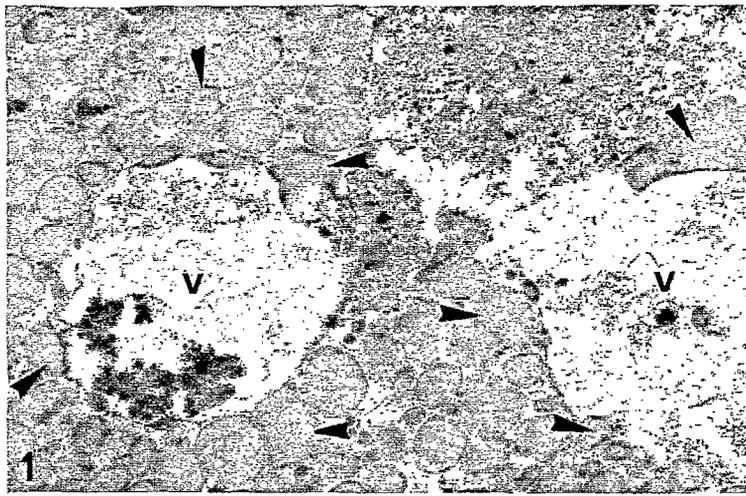


PLANCHE XV

Glutaraldéhyde-tétroxyde d'osmium ; acétate d'uranyle-citrate de plomb (1 à 7)

COLONISATION ET DEGRADATION DES TISSUS RACINAIRES NON LIGNIFIES

- 1 : microvacuolisation du cytoplasme d'un laticifère (flèche) ; x 19000.
- 2 : éclatement des membranes vacuolaires libérant leur contenu dans le cytoplasme. On constate, sur le cliché, l'imbrication d'un lutoïde (l) avec les microcoagula (mc) ; x 30000.
- 3 : éclatement d'une vacuole classique (v) ; x 30000.
- 4 : fusion des microcoagula et disparition des structures membranaires ; x 50000.
- 5 : fusion (flèches) de microvacuoles pour en former de plus grandes (v) ; x 50000.
- 6 : stade ultime de la coagulation du latex : prise en masse du caoutchouc (cc) ; x 9000.
- 7 : la coagulation peut intervenir sans perturbation des cellules voisines. Sur le cliché, les organites de la cellule parenchymateuse limitrophe ont un aspect normal ; (cc : caoutchouc coagulé ; mi : mitochondrie ; mn : membrane nucléaire ; n : noyau ; p : paroi ; pl. : plasmalemme) ; x 7500.

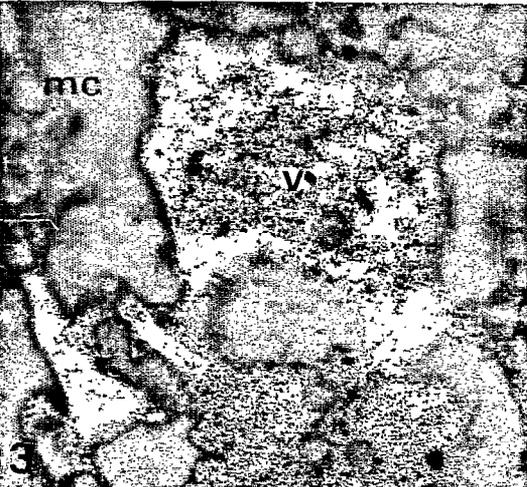
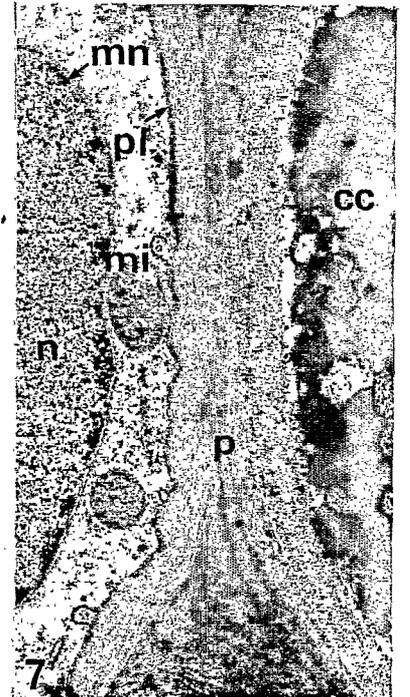
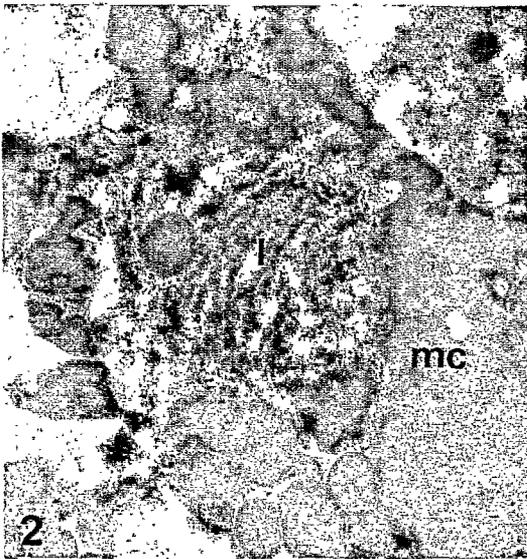
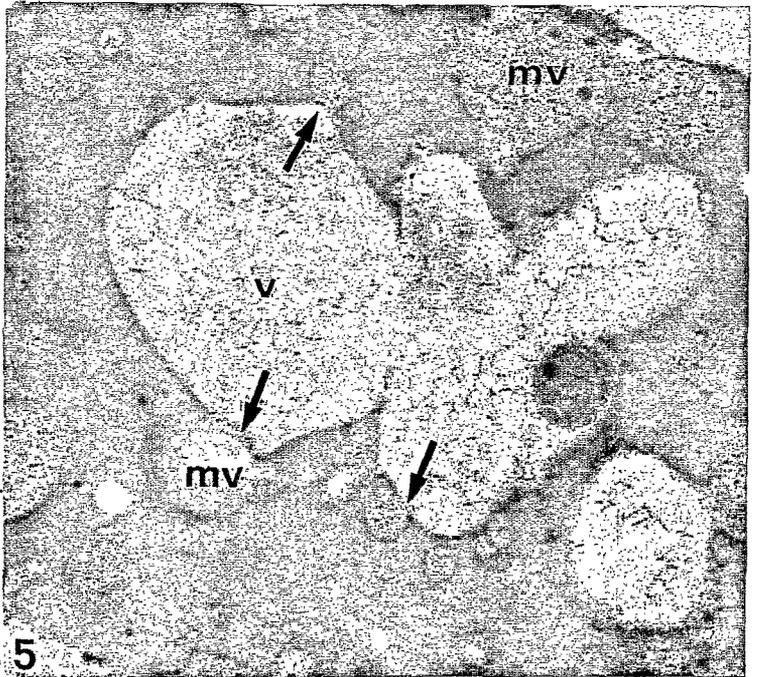
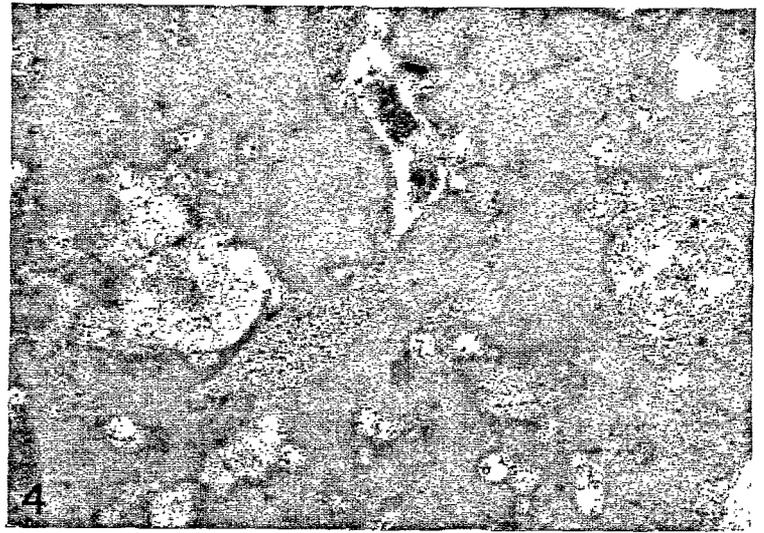
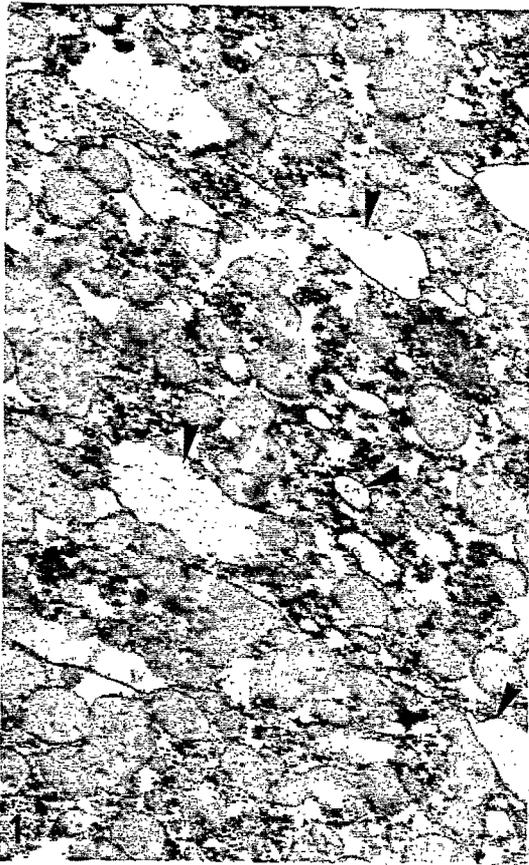


PLANCHE XVI

Glutaraldéhyde-tétroxyde d'osmium ; acétate d'uranyle-citrate de plomb (2) ;

Permanganate de potassium, acétate d'uranyle - citrate de plomb (3)

Coupe au rasoir, non fixées : permanganate de potassium (1 et 4)

COLONISATION ET DEGRADATION DES TISSUS RACINAIRES LIGNIFIES

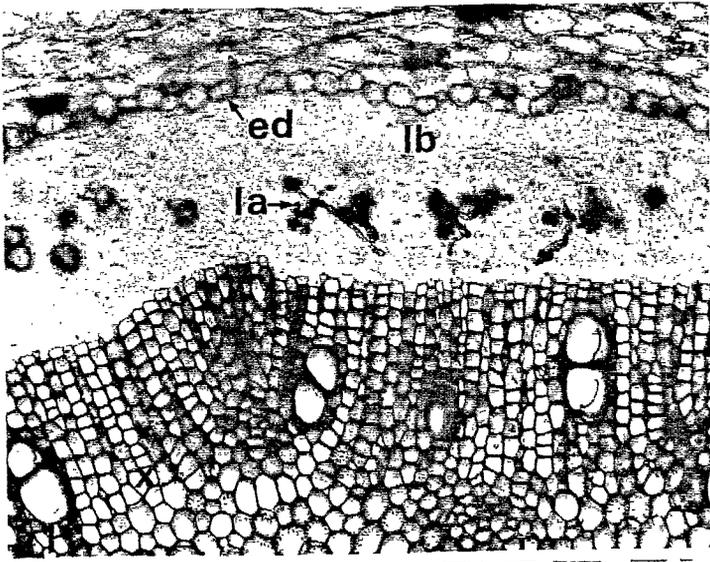
(*IN VIVO*)

1 : MP : aspect du cylindre central d'une racine de 6 semaines ; le xylème (x) est coloré au permanganate de potassium (ed : endoderme ; la : laticifère ; lb : liber) ; x 350.

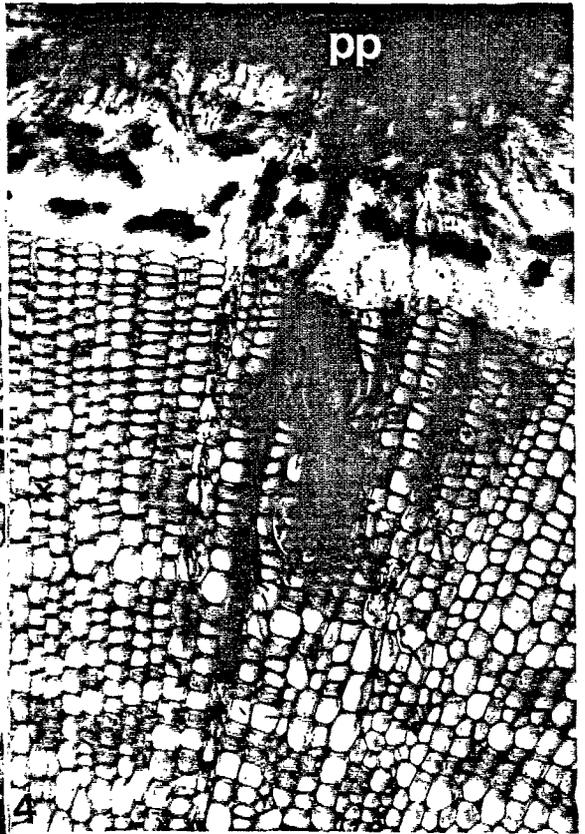
2 : pore, entre deux cellules d'un rayon parenchymateux ; x 20000.

3 et 3' : organisation des parois d'un vaisseau du xylème ; (lm : lamelle moyenne ; PI : paroi primaire ; PIIS<sub>1</sub> ; PIIS<sub>2</sub> et PIIS<sub>3</sub> : fraction S<sub>1</sub>, S<sub>2</sub> et S<sub>3</sub> de la paroi secondaire ; x 20000.

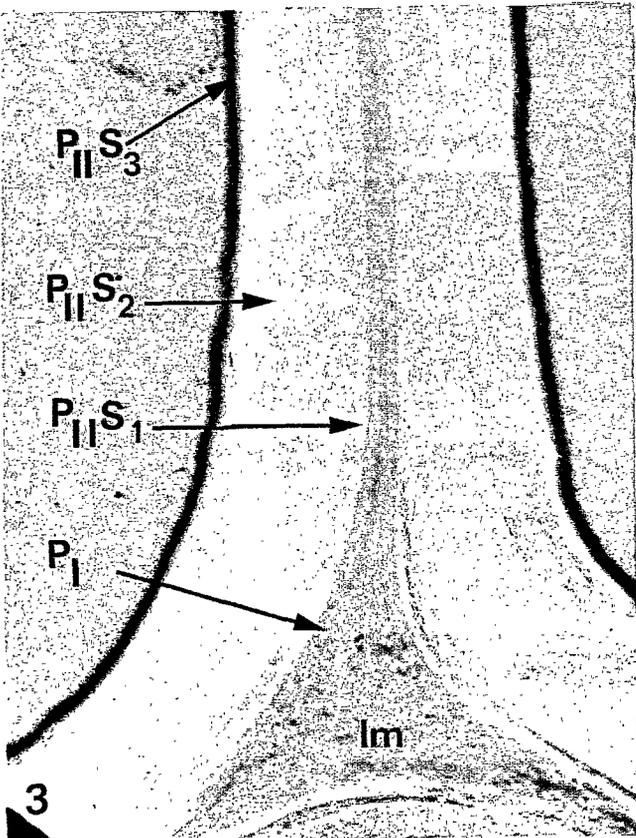
4 : colonisation du xylème (x) par les filaments mycéliens, sous un point de pénétration (pp) ; au voisinage des vaisseaux les hyphes se ramifient pour les envahir ; x 500.



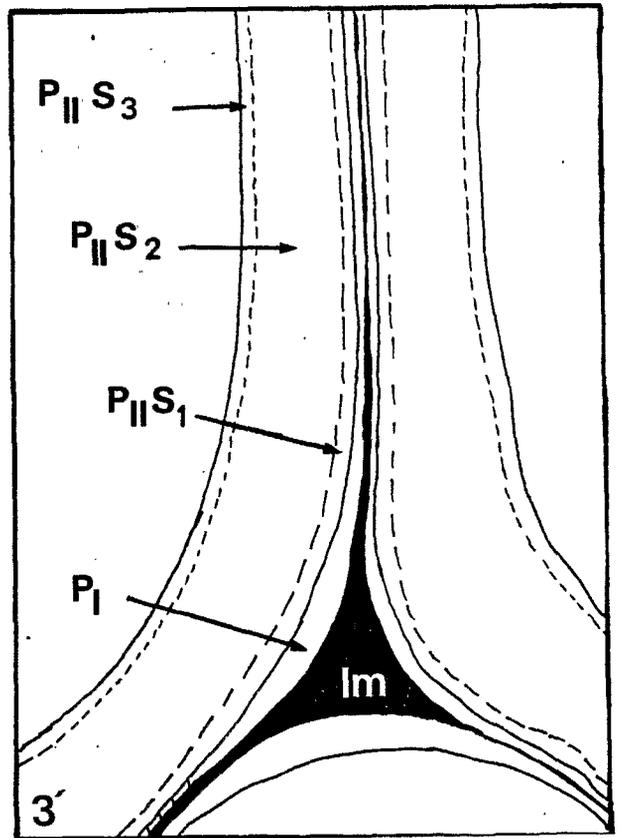
2



4



3



3'

PLANCHE XVII

Glutaraldéhyde tétroxyde d'osmium ; acétate d'uranyle-citrate de plomb (2 et 3)

Glutaraldéhyde-tétroxyde d'osmium ; bleu de méthylène (4)

Coupes au rasoir, non fixées ; permanganate de potassium (1) ou bleu d'aniline (5)

COLONISATION ET DEGRADATION DES TISSUS RACINAIRES LIGNIFIES

(*IN VIVO*)

- 1 : colonisation préférentielle du xylème par les rayons parenchymateux (flèches), (v : vaisseau) ; x 500.
- 2 : passage d'une hyphe (h) par les ponctuations, d'un rayon parenchymateux à un vaisseau, (p : paroi) ; x 16000.
- 3 : différenciation d'une microhyphe (mh) par un filament mycélien (h) ; x 16000.
- 4 : coupe semi-fine ; perforation des parois des cellules du xylème par les hyphes mycéliennes (flèches) ; x 3000.
- 5 : MP à fluorescence ; xylème nécrosé : les parois émettant une moindre fluorescence sont dégradées par le parasite ; x 750.

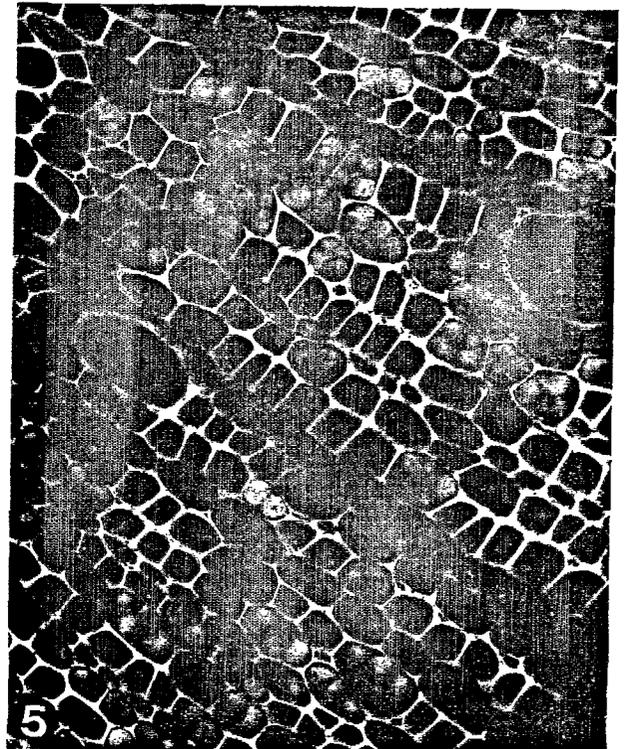
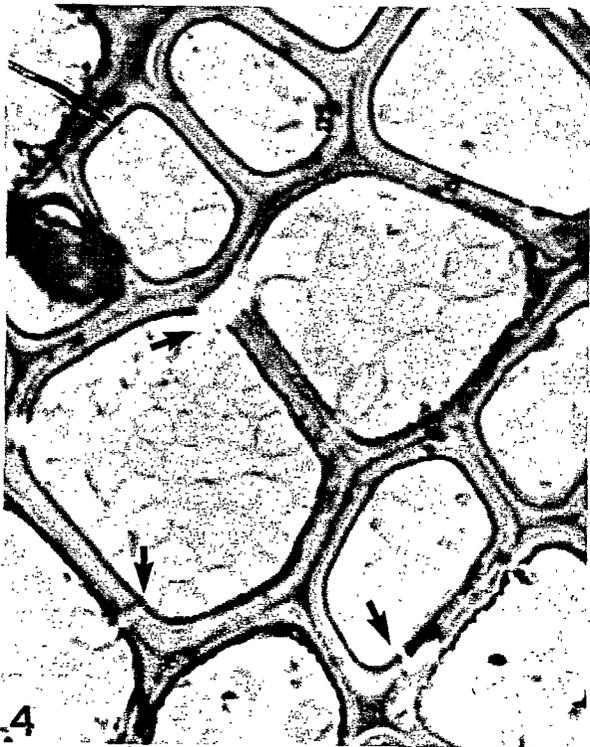
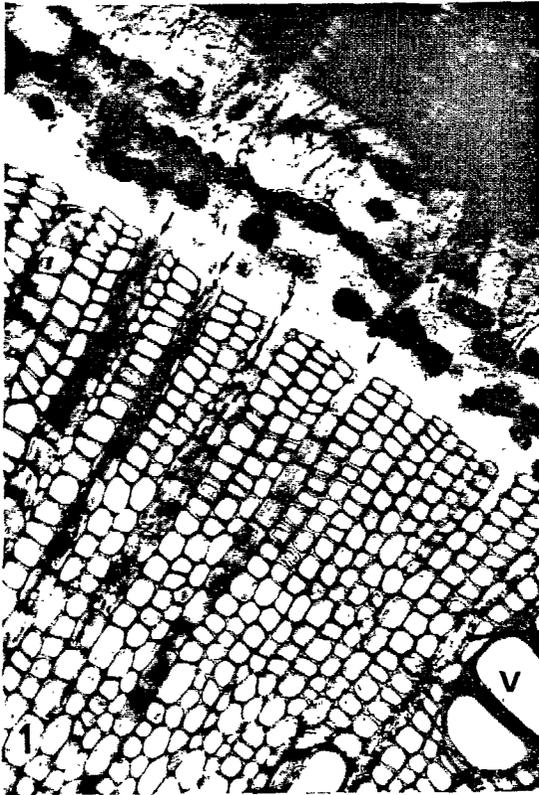


PLANCHE XVIII

Glutaraldéhyde-tétroxyde d'osmium ; acétate d'uranyle et citrate de plomb (1, 2, 3)

COLONISATION ET DEGRADATION DES TISSUS RACINAIRES LIGNIFIES  
(*IN VIVO*)

- 1 et 1' : *in vivo*, l'altération des parois du xylème débute très souvent au niveau de la lamelle moyenne (lm) et de la paroi primaire ( $P_I$ ) : désorganisation de la structure initiale (1) démasquant une matrice (2) qui se perfore et fait place à un méat (3) ; x 40000.
- 2 : idem à un stade plus avancé ; x 37500.
- 3 : évolution de la dégradation des parois du xylème (flèches), dans le sens lamelle moyenne → paroi secondaire ( $P_{II}$ ) ; x 40000.

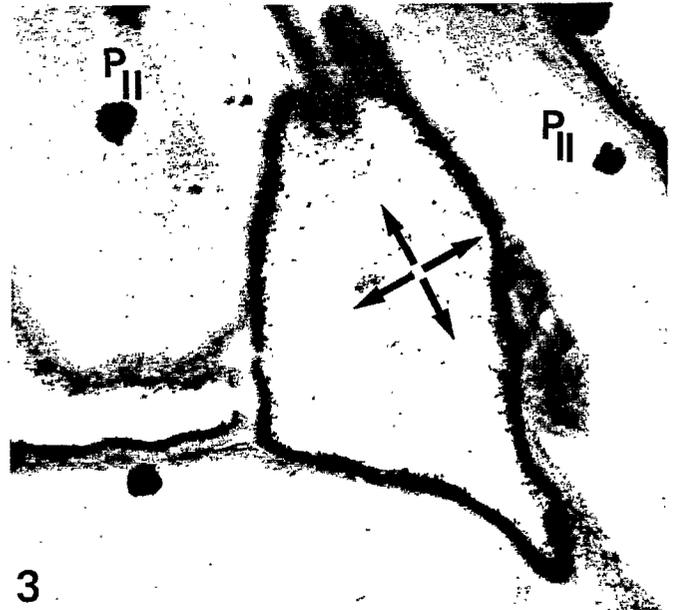
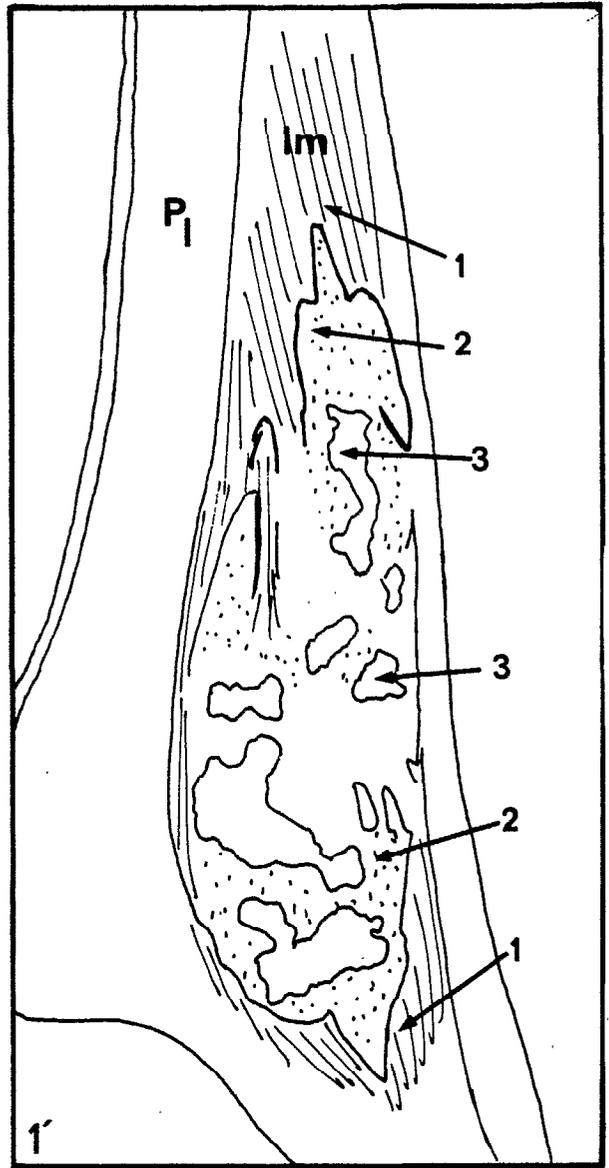


PLANCHE XIX

Glutaraldéhyde - tétroxyde d'osmium ; acétate d'uranyle - citrate de plomb (1 à 4)

COLONISATION ET DEGRADATION DES TISSUS RACINAIRES LIGNIFIES  
(*IN VIVO*)

- 1 : la zone limite entre S<sub>1</sub> et S<sub>2</sub> est particulièrement sensible à l'action du champignon ; cela se traduit par l'apparition de nombreuses alvéoles (flèches) ; x 50000.
- 2 : la fusion de ces alvéoles provoque une zone de déhiscence, perpendiculaire à l'orientation des fibres (flèches) ; x 40000.
- 3 : évolution de la digestion de la fraction S<sub>2</sub> dans le sens d'orientation des fibres (flèches) ; x 30000.
- 4 : plus rarement, l'attaque des parois par les hyphes (h) s'amorce à partir de la lumière des cellules, dans le sens S<sub>3</sub> → lamelle moyenne (lm). Dans ce cas, la fraction S<sub>3</sub> est altérée au contact du mycélium (flèches) ; x 37500.

(témoin : cliché 3 pl. XVI)

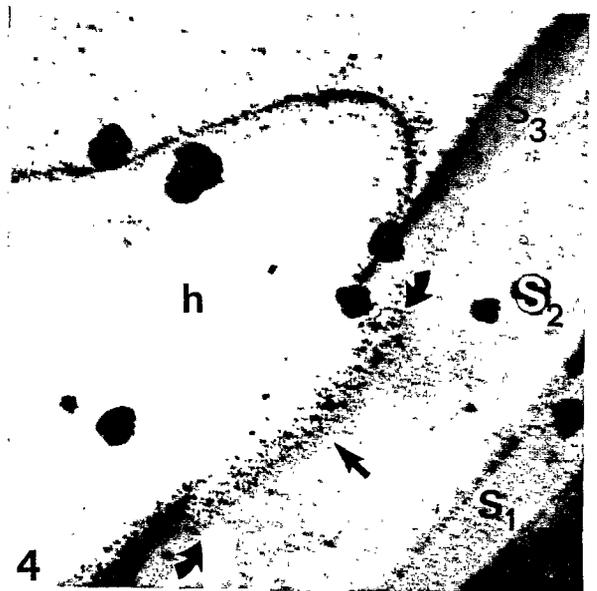
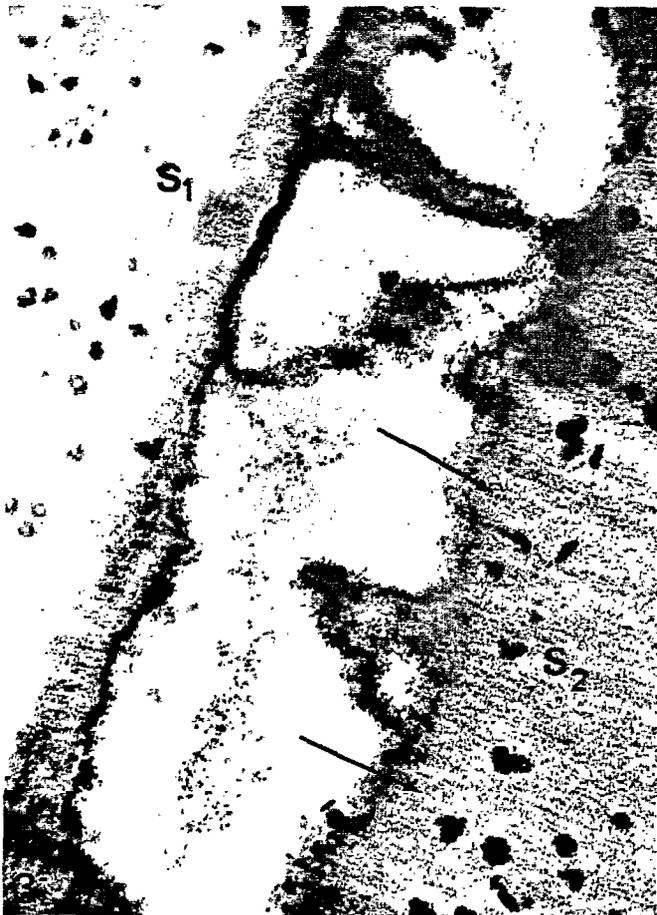
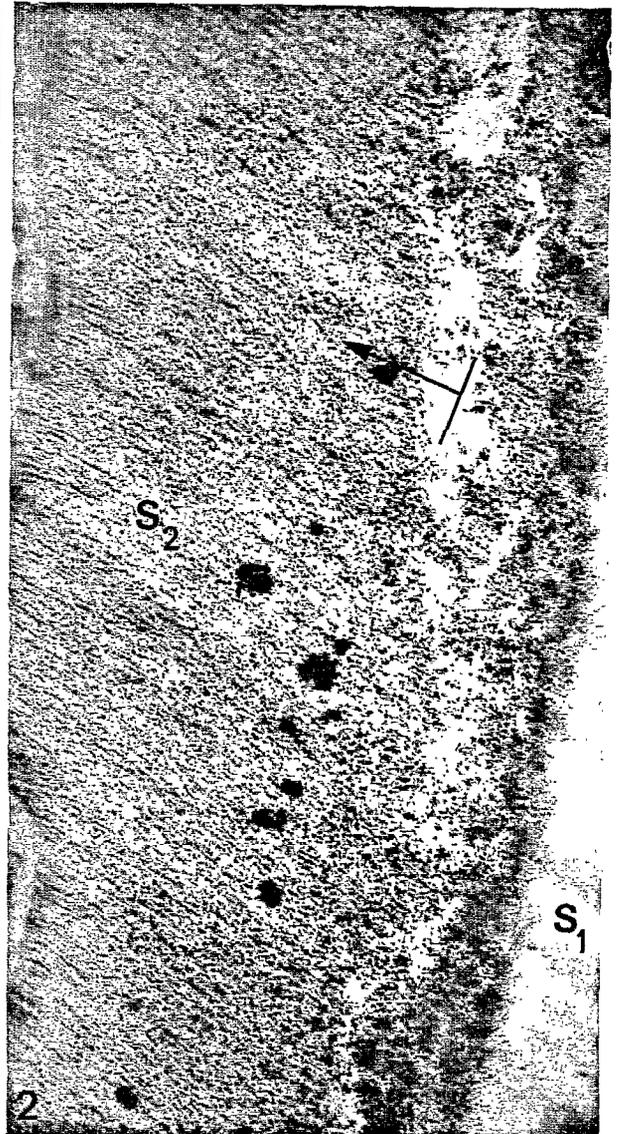


PLANCHE XX

Coupes au rasoir, non fixées : permanganate de potassium (1 et 2)  
Glutaraldéhyde - tétroxyde d'osmium ; acétate d'uranyle - citrate de  
plomb (3 à 7)

COLONISATION ET DEGRADATION DES TISSUS RACINAIRES LIGNIFIES

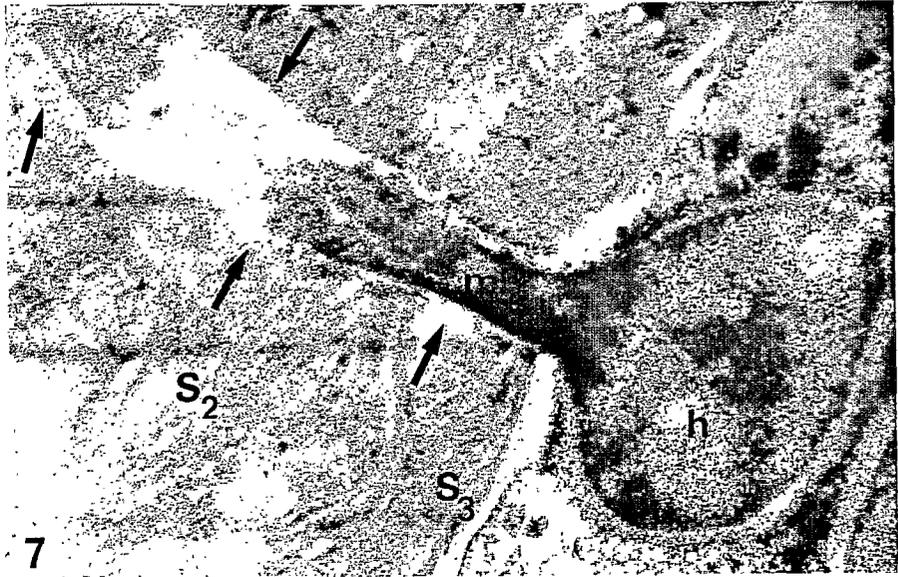
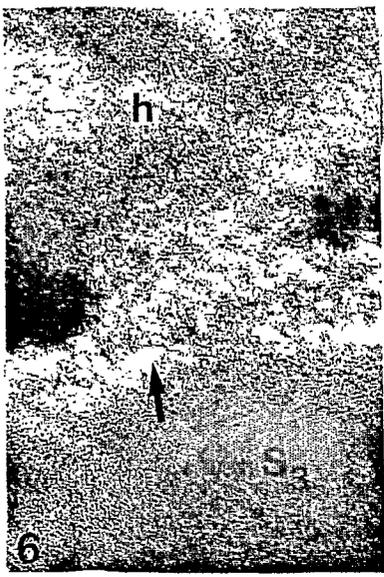
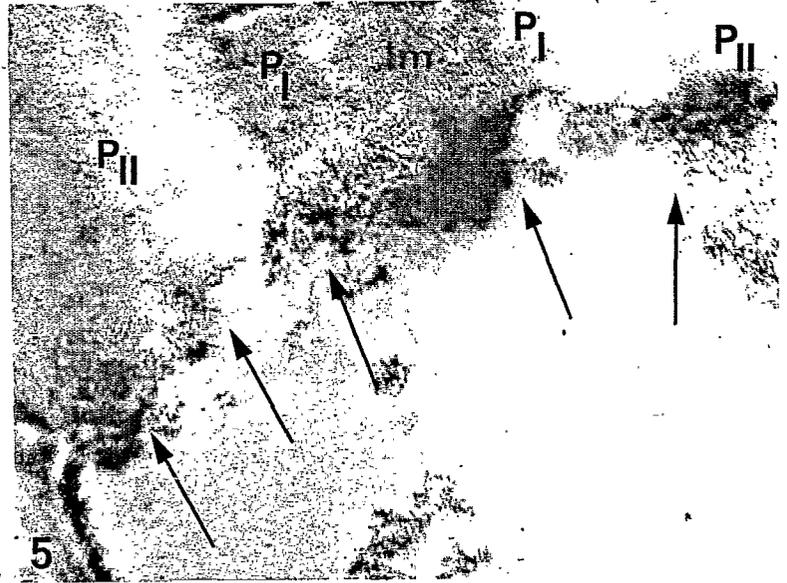
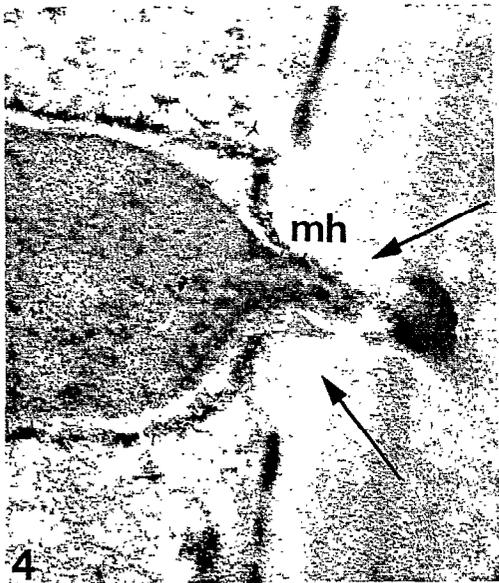
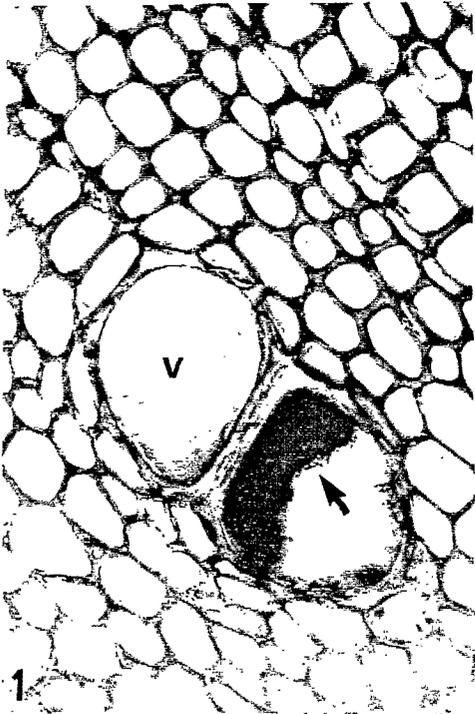
(*IN VIVO*)

- 1 : MP : début d'obturation des vaisseaux (v). Des dépôts denses s'accumulent contre les parois (flèche) ; x 750.
- 2 : obturation totale des vaisseaux par des produits de dégradation qui réagissent souvent positivement aux tests des lignines ; x 500.
- 3 : accumulation de dépôts denses (flèches) au niveau des ponctuations ; (p : paroi) ; x 20000.

COLONISATION ET DEGRADATION DES TISSUS RACINAIRES LIGNIFIES

(*IN VITRO*)

- 4 : attaque des parois (p) par l'intermédiaire de microhyphes (mh) digestion de contact des fractions pariétales concernées (flèches) ; x 40000.
- 5 : altération de toutes les fractions pariétales (flèches), sans résistance particulière de l'une d'entre elles ; x 60000.  
(lm : lamelle moyenne ; P<sub>I</sub> : paroi primaire ; P<sub>II</sub> : paroi secondaire).
- 6 : dégradation de la fraction S<sub>3</sub> de la paroi secondaire (flèche) au contact d'une hyphe (h) ; x 75000.
- 7 : digestion des parois (flèches) en avant et au contact des microhyphes (mh) (h : hyphe ; S<sub>2</sub> et S<sub>3</sub> : fractions de la paroi secondaire) ; x 30000.



## PLANCHE XXI

Glutaraldéhyde - tétroxyde d'osmium ; acétate d'uranyle et citrate de plomb (2) ou permanganate de potassium (1)

Formol - alcool éthylique - acide acétique ; bleu de picroaniline et safranine (3 à 6)

### COLONISATION ET DEGRADATION DES TISSUS RACINAIRES LIGNIFIES (IN VITRO)

- 1 : accumulation autour des hyphes (h) de composés fibreux (flèches), réagissant au permanganate de potassium ; x 75000.
- 2 : désorganisation du complexe ligno-pectique (flèche) de la lamelle moyenne et de la paroi primaire (P<sub>I</sub>) ; x 16000.

### PENETRATION DE LA RACINE PAR *P. NOXIUS*

- 3 : MP; pénétration du parasite (flèches) dans les tissus corticaux. Le manchon mycélien (m) au contact du périoderme n'occasionne aucune déchirure des tissus identique à celle provoquée par *R. lignosus* ; x 450.
- 4 : MP; le contact intime entre le manchon mycélien (m) et la racine, favorise une colonisation rapide des premières assises cellulaires du cortex (c) ; x 750.
- 5 : MP; action digestive du champignon (m), au cours de la pénétration, sur les parois du périoderme de la racine (flèche) ; x 700.
- 6 : MP; position intracellulaire des hyphes (h) dans les cellules du parenchyme cortical primaire. Le passage d'une cellule à l'autre s'effectue par la perforation des parois (flèches). A ce stade, le mycélium est épais et se colore parfaitement au bleu de picroaniline ; x 3500.

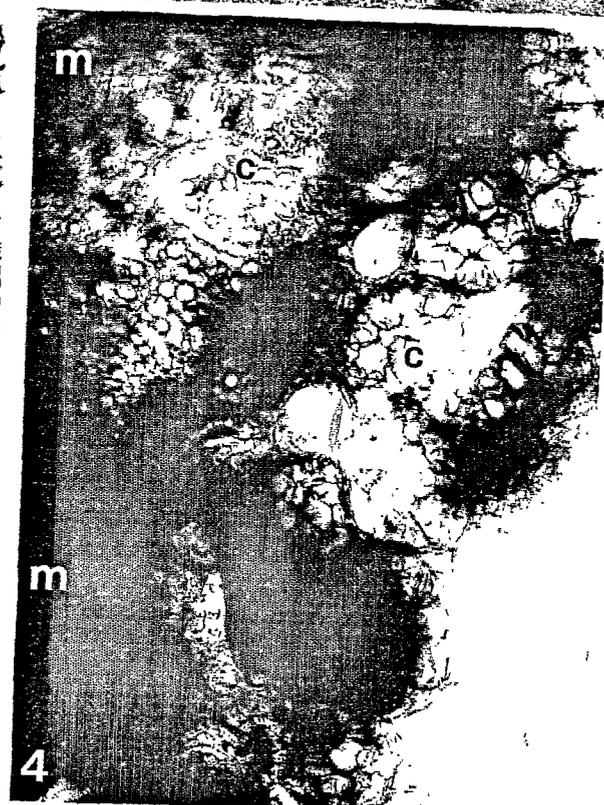
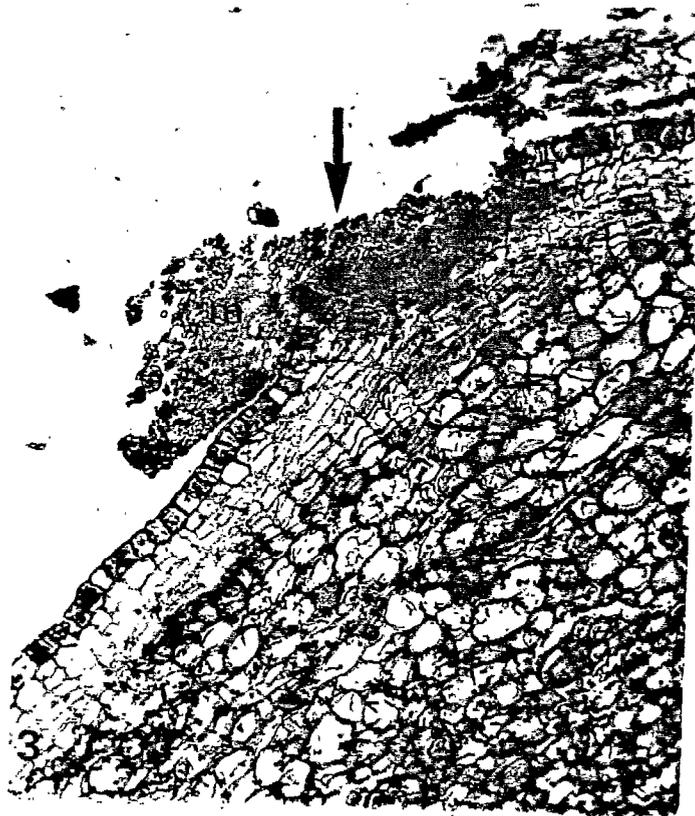
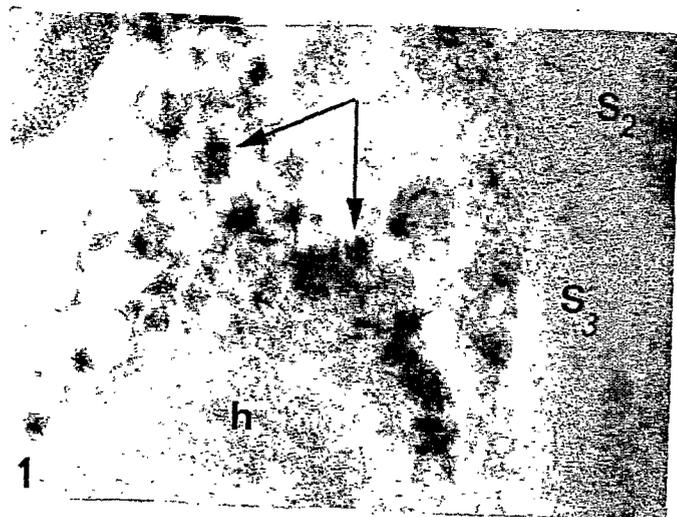


PLANCHE XXII

Formol - alcool éthylique - acide acétique ; bleu de picroaniline  
safranine (1 à 6)

COLONISATION ET DEGRADATION DES TISSUS RACINAIRES NON LIGNIFIES  
PAR *P. NOXIUS*

- 1 : MP ; intense colonisation du cortex dont la lumière des cellules est souvent totalement envahie après rupture des parois (flèches) ; x 750.
- 2 : MP; dégradation du tissu subérifié ; les parois subérifiées, fortement altérées, ont perdu leur rigidité (flèches) ; x 5000.
- 3 : MP; cette image traduit les difficultés rencontrées par *P. noxius* pour coloniser le xylème d'une jeune plante. Les tissus non lignifiés (c,p : cortex et phloème) sont totalement envahis par les hyphes alors que peu ou pas de filaments ne sont visibles dans le xylème (x) ; x 300.
- 4 : MP; ramifications d'une hyphe (flèches) colonisant le xylème ; x 3700.
- 5 : MP; hyphe épaisse (h) en position intracellulaire dans un rayon parenchymateux du xylème ; x 7500.
- 6 : MP; colonisation du parenchyme médulaire (pm) par les filaments mycéliens (h), dont l'épaisseur et le contraste sont remarquables ; (v : vaisseau) ; x 2200.

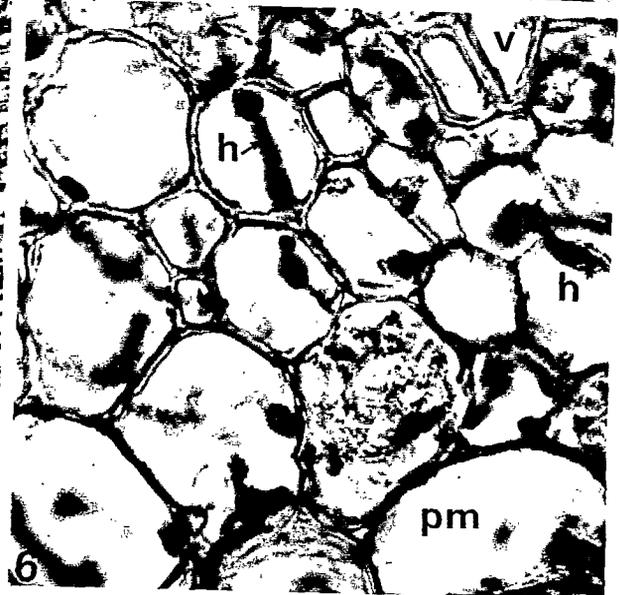
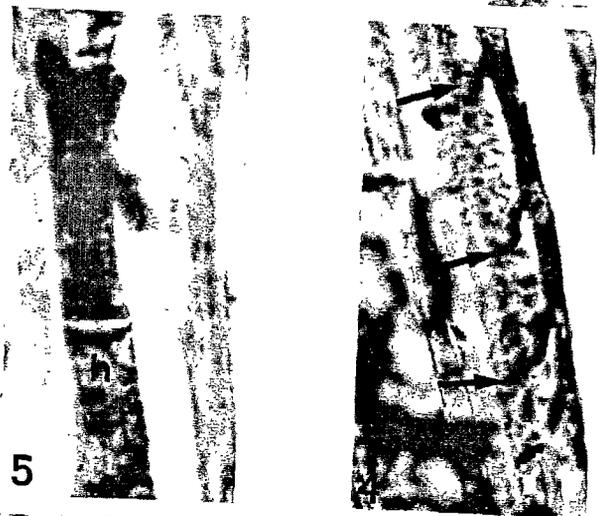
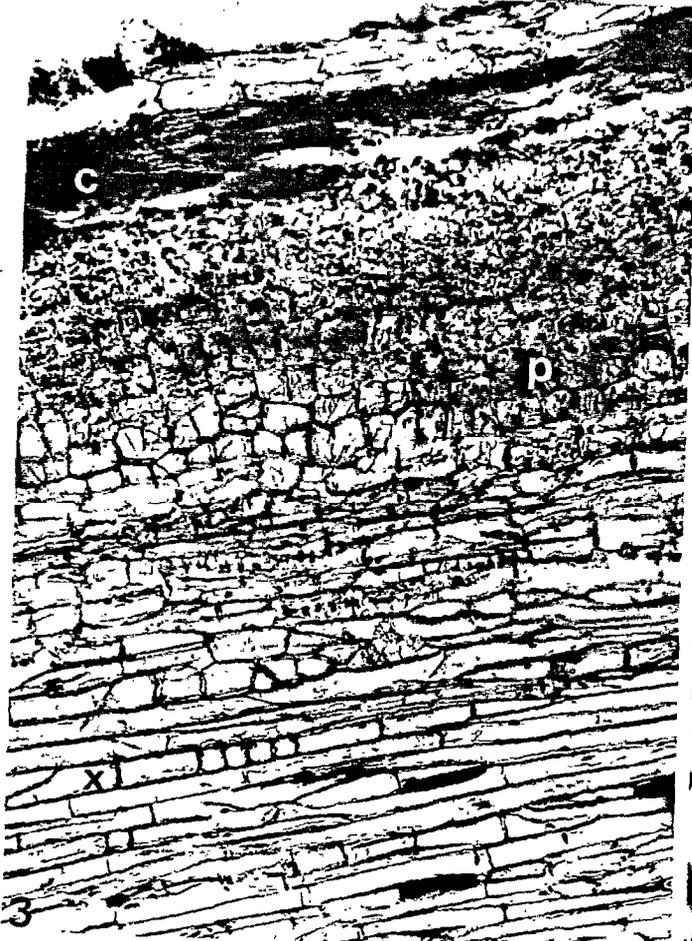
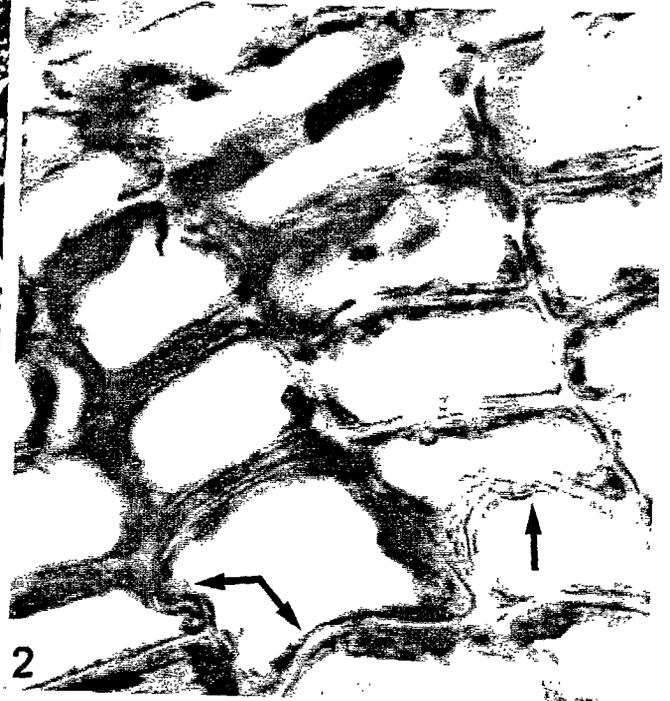


PLANCHE XXIII

Formol - alcool éthylique - acide acétique ; bleu de picroaniline  
safranine (1,2)

Glutaraldéhyde - tétroxyde d'osmium ; acétate d'uranyle - citrate  
de plomb (3 à 5)

COLONISATION ET DEGRADATION DES TISSUS RACINAIRES LIGNIFIES  
PAR *P. NOXIUS*

- 1 : MP; dans les vaisseaux, les hyphes (h) se déplacent au contact de la fraction S<sub>3</sub> de la paroi secondaire ; x 3000.
- 2 : MP; propagation d'une hyphe à la faveur des perforations d'un vaisseau (flèches) ; X 2200.
- 3 : altération de la lamelle moyenne (lm) ; augmentation de l'osmiophilie et digestion des polysaccharides qui la composent (flèches) ; x 30000.
- 4 : perforation de la lamelle moyenne et extension de l'action dégradante vers les parois primaire P<sub>I</sub> et secondaire P<sub>II</sub> (flèches) ; x 13000.
- 5 : action corrosive des enzymes secrétées par les hyphes sur la lamelle moyenne et les fibres de la paroi primaire (flèches) ; x 80000.

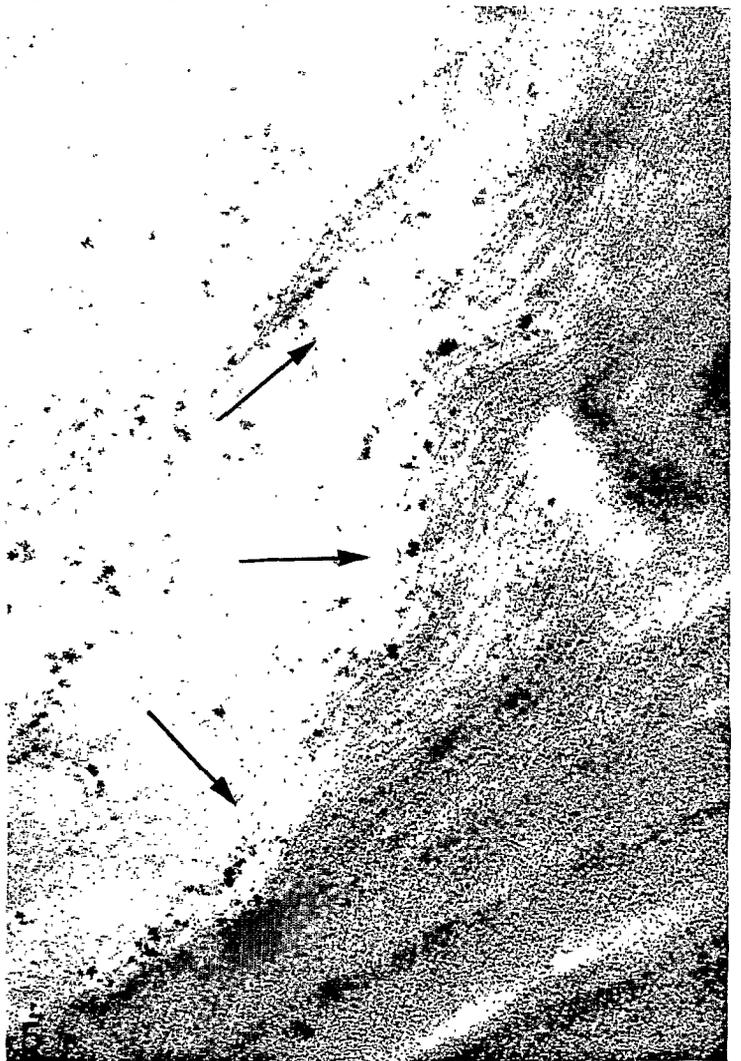
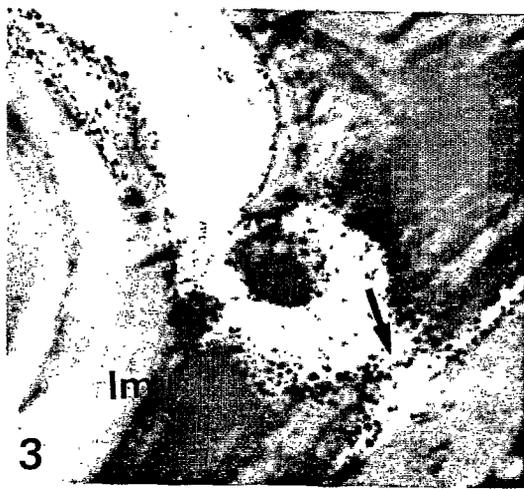


PLANCHE XXIV

Glutaraldéhyde - tétroxyde d'osmium ; acétate d'uranyle - citrate de plomb (1 à 3)

Formol - alcool éthylique - acide acétique ; bleu de picroaniline - safranine (4 à 7)

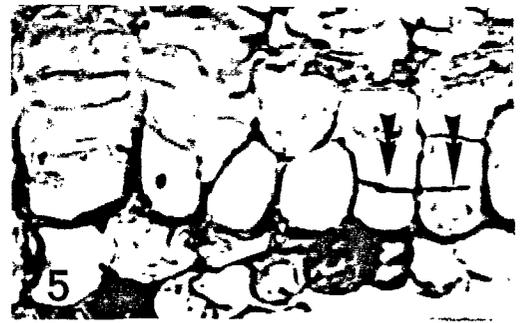
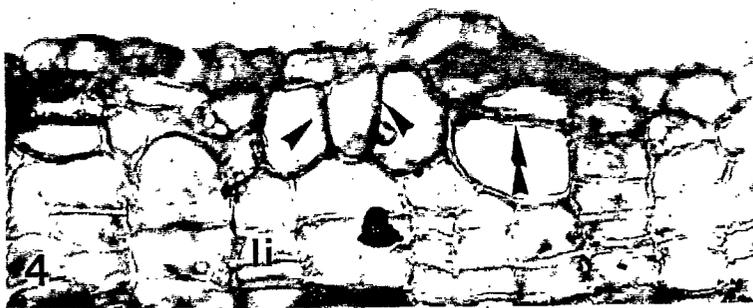
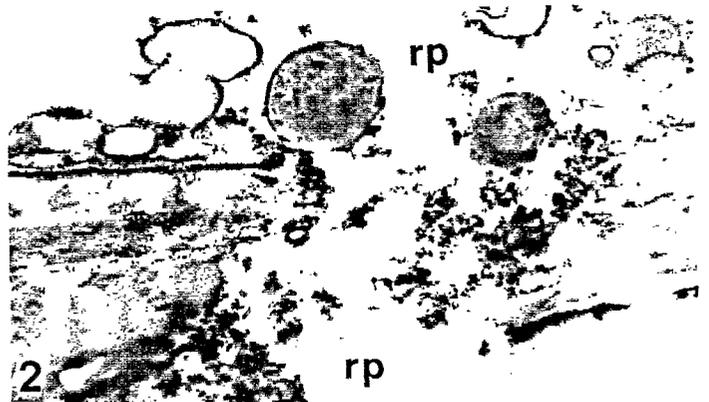
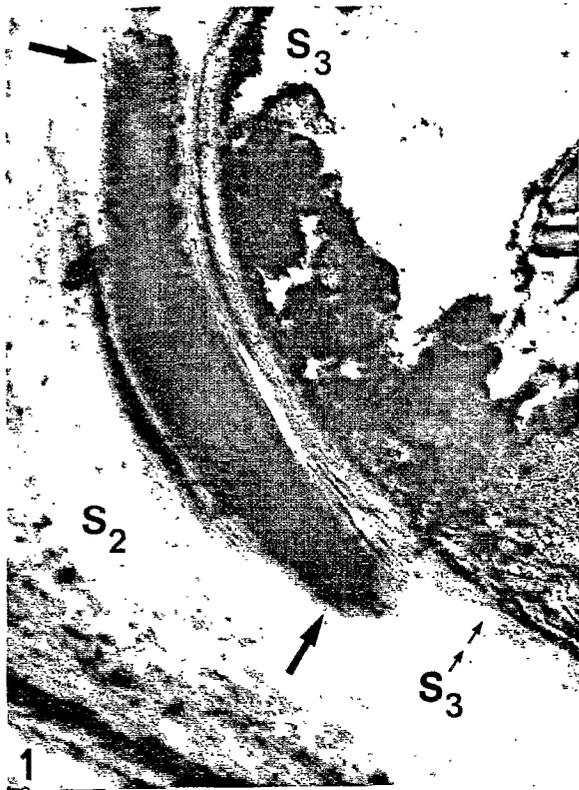
COLONISATION ET DEGRADATION DES TISSUS RACINAIRES LIGNIFIES

PAR P. NOXIUS

- 1 : altération de la fraction S<sub>2</sub> de la paroi secondaire : augmentation sensible de l'osmiophilie (flèches) ; S<sub>3</sub> : fraction interne de la paroi secondaire ; x 30000.
- 2 : rupture et digestion d'une partie des parois entre deux cellules de rayons parenchymateux (rp) ; x 16000.
- 3 : mycélium (h) en position intrapariétale dans la fraction S<sub>2</sub> de la paroi secondaire ; celle-ci n'est altérée qu'au contact de l'hyphe (flèche) ; x 19500.

LES REACTIONS PRECOCES

- 4 et 5 : MP; hyperplasie cellulaire : cloisonnements anticlines (flèches) et périclines (double flèches) de certaines jeunes cellules du futur liège (li) ; x 1250.
- 6 : MP; hypertrophie cellulaire : augmentation du volume de certaines jeunes cellules du futur liège. Cette réaction se développe souvent autour de quelques cellules nécrosées (flèche) ; (ap : assise péridermique) ; x 1250.
- 7 : MP; hypertrophie cellulaire : les cellules hypertrophiées (flèches) isolent localement la zone infectée ; x 500.



## PLANCHE XXV

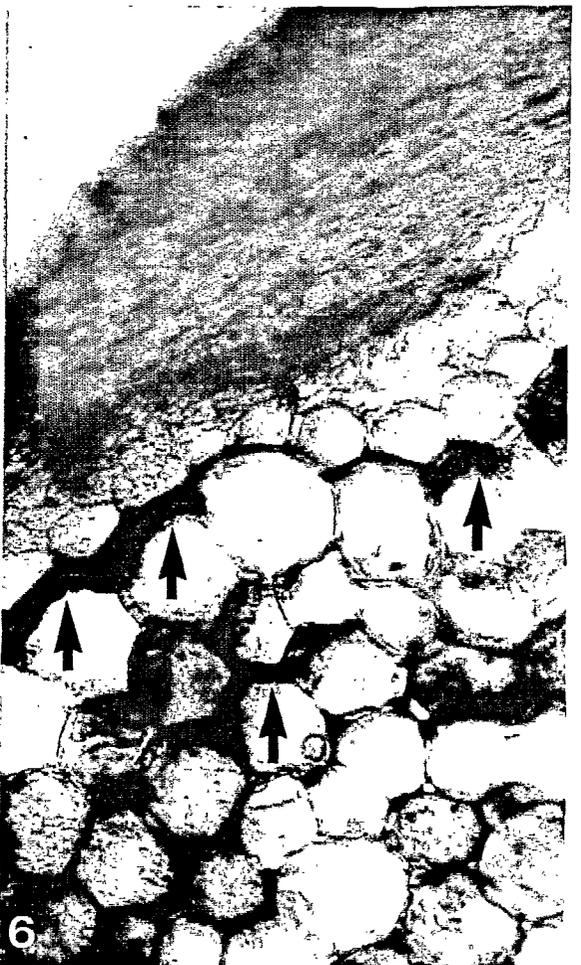
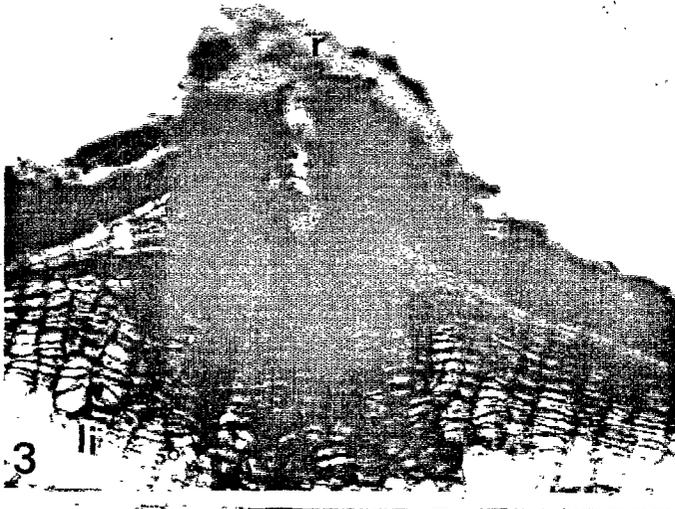
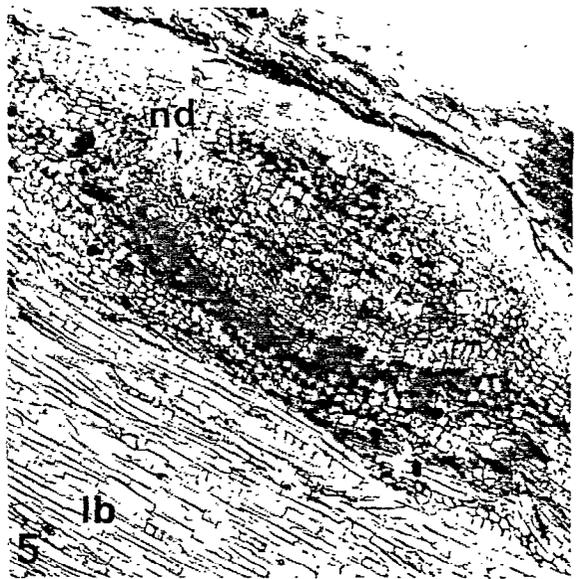
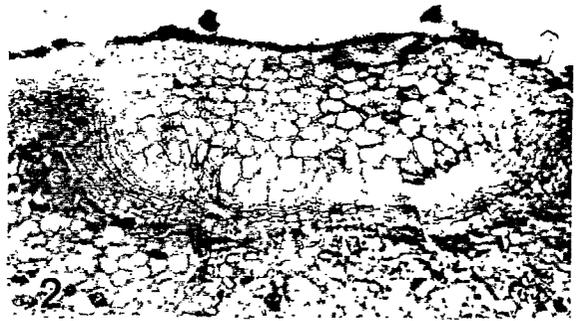
Formol - alcool éthylique - acide acétique ; bleu de picroaniline - safranine (1 à 5) ou phloroglucine-HCl (6)

### LES REACTIONS PRECOCES

- 1 : MP; l'hypertrophie des jeunes cellules du liège (li) provoque un tassement des cellules normales sous-jacentes (flèches) ; x 500.
- 2 : MP; l'hypertrophie et l'hyperplasie cellulaire conduisent à la formation d'amas de cellules dépourvus de filaments fongiques ; X 200.

### LES REACTIONS POST INITIALES

- 3 et 4 : MP; exhaltation de l'activité cambiale subérophello-dermique soit dans les sens du liège (li ; 3) soit dans le sens du phello-derme (ph; 4) des jeunes racines ; (r : rhizomorphe);
- 3 : X 400
- 4 : X 600.
- 5 : MP; cette activité cambiale aboutit à la différenciation de nodules cellulaires (nd), interne à la racine ; (lb : liber); x 200.
- 6 : MP; épaissement des parois de cellules du parenchyme cortical primaire (flèches), réagissant positivement au test des lignines ; (r : rhizomorphe) ; x 1250.



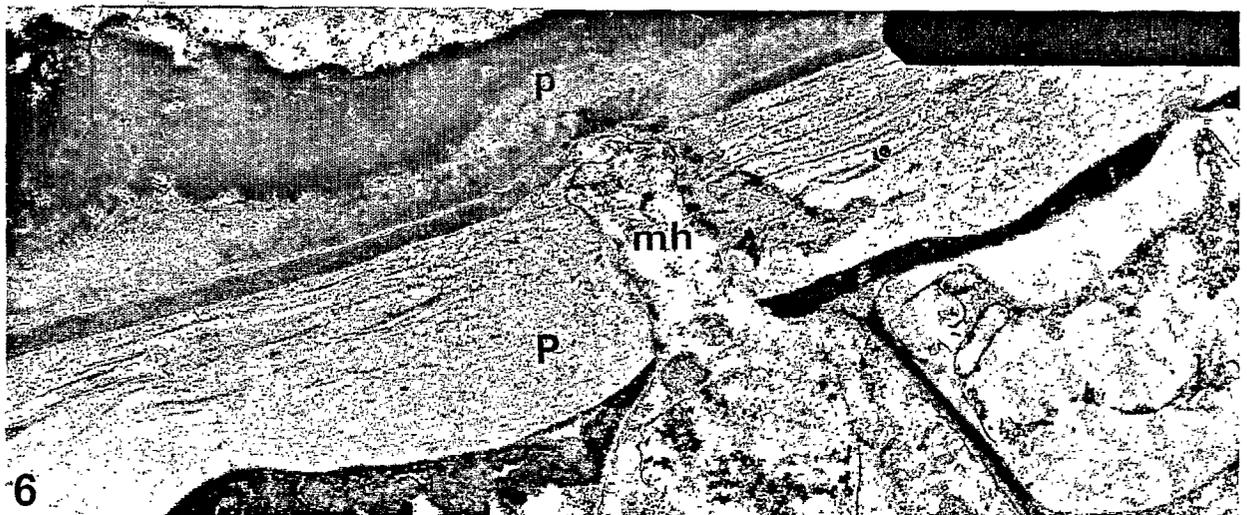
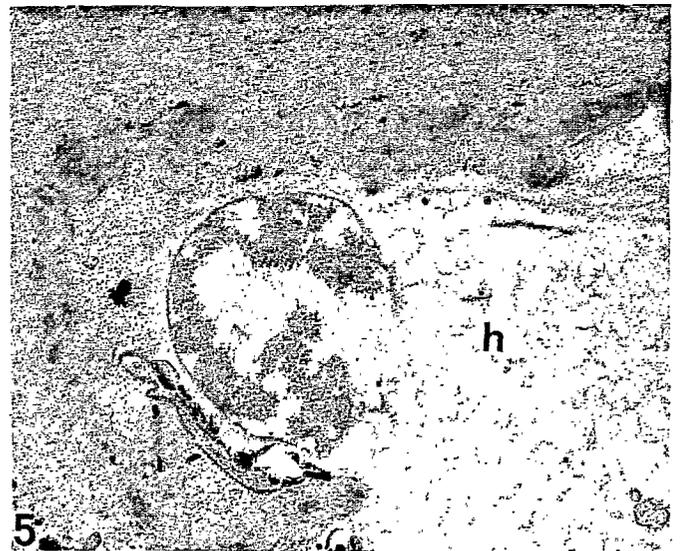
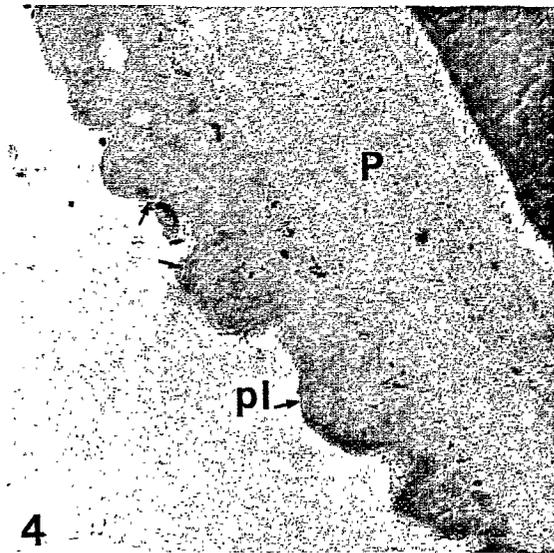
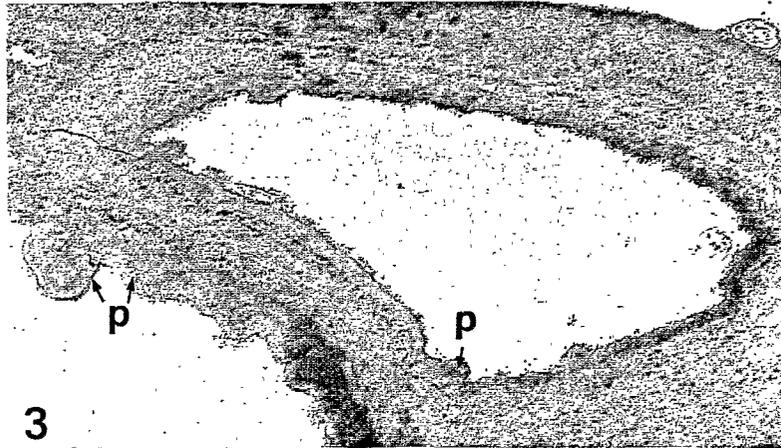
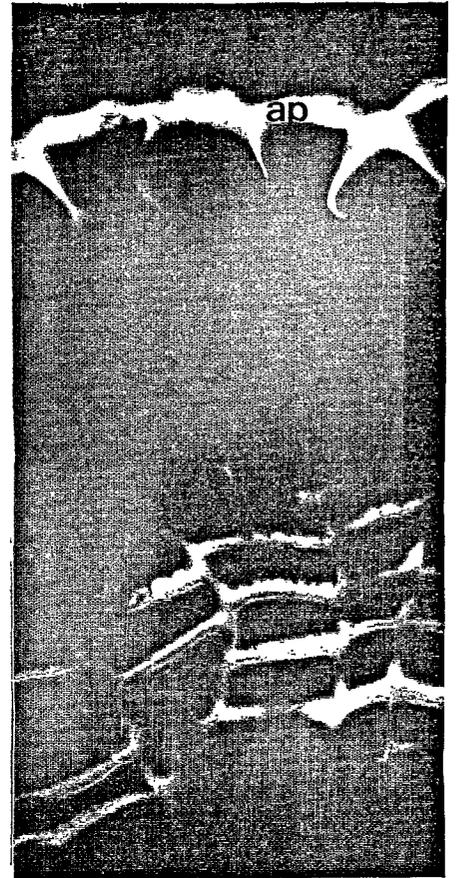
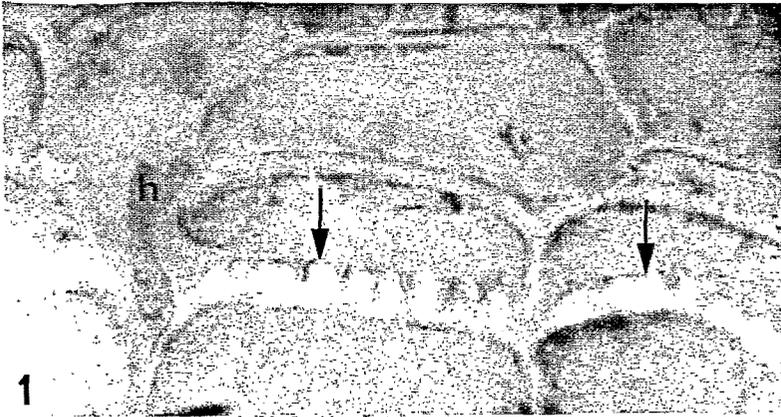
## PLANCHE XXVI

Glutaraldéhyde - tétroxyde d'osmium ; acétate d'uranyle - citrate de plomb (3 à 6)

Coupe réalisée au rasoir, non fixée : bleu d'aniline (2) ou bleu coton (1)

### LES REACTIONS INTERVENANT AU COURS DE LA COLONISATION DES TISSUS

- 1 : MP; parois festonnées de certaines cellules du liège (flèches) ; (h : hyphe) ; x 5000.
- 2 : microscopie à fluorescence; les parois festonnées émettent une lumière fluorescente, après imprégnation du tissu dans le bleu d'aniline et observation en lumière ultra-violette; (ap : assise cellulaire externe) ; x 1250.
- 3 : des dépôts ou papilles (p), moyennement denses aux électrons confèrent cet aspect crénelé aux parois du liège ; X 19500.
- 4 : les papilles (p) ont une constitution granuleuse et semblent se différencier dans l'espace périplasmique de la cellule ; (pl : plasmalemma ; p : paroi) ; x 16000.
- 5 : très souvent, ces papilles (p) se différencient au contact des hyphes (h) ; x 25000.
- 6 : formation d'une papille (p) au voisinage d'une microhyphe (mh) se propageant dans la paroi (p) ; x 16000.



## PLANCHE XXVII

Glutaraldéhyde - tétroxyde d'osmium ; acétate d'uranyle - citrate de plomb (1 à 5) ou bleu de méthylène (8)

Coupes réalisées au rasoir, non fixées, phloroglucine-HCl (6 et 7)

### LES REACTIONS INTERVENANT AU COURS DE LA COLONISATION DES TISSUS

- 1 : papille très épaisse (p) en cours de dégradation (flèches) par les hyphes (h) ; x 13000.
- 2 : les papilles dégradées (p) par les hyphes (h) deviennent osmiophiles ou d'aspect hétérogène (flèche) ; x 16000.
- 3 : pore (p) d'un tube criblé (tc) d'un liber sain. Aucun dépôt n'entrave les échanges cellulaires ; x 10000.
- 4 : dépôt (d) obstruant un pore d'un tube criblé (tc) dans un liber parasité ; x 15000.
- 5 : ces dépôts ont une constitution généralement granuleuse et fluorescent en lumière ultraviolette ; x 26000.
- 6 : MP; perturbation du processus de lignification des cellules du jeune xylème. Des îlots cellulaires se lignifient (flèches) au-delà du cambium libéro-ligneux localisé par les doubles flèches ; x 330.
- 7 : MP; formation d'un tylose (ty) dans un vaisseau du xylème en début d'attaque ; x 500.
- 8 : MP; coupe semi-fine. Dépôts, au sein d'une fibre, localisés contre la paroi secondaire ; x 3200.

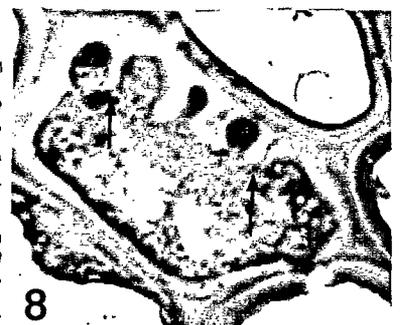
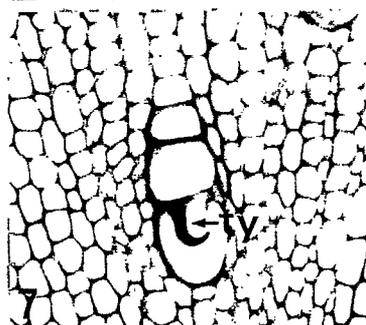
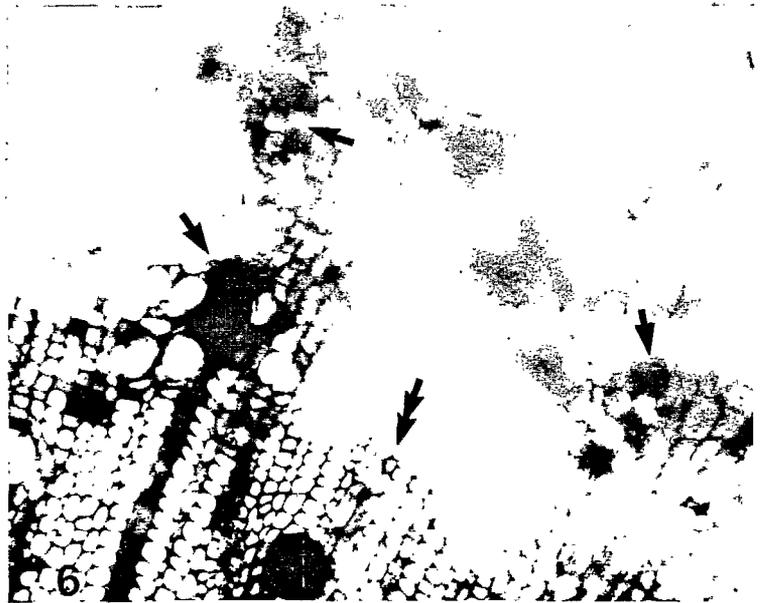
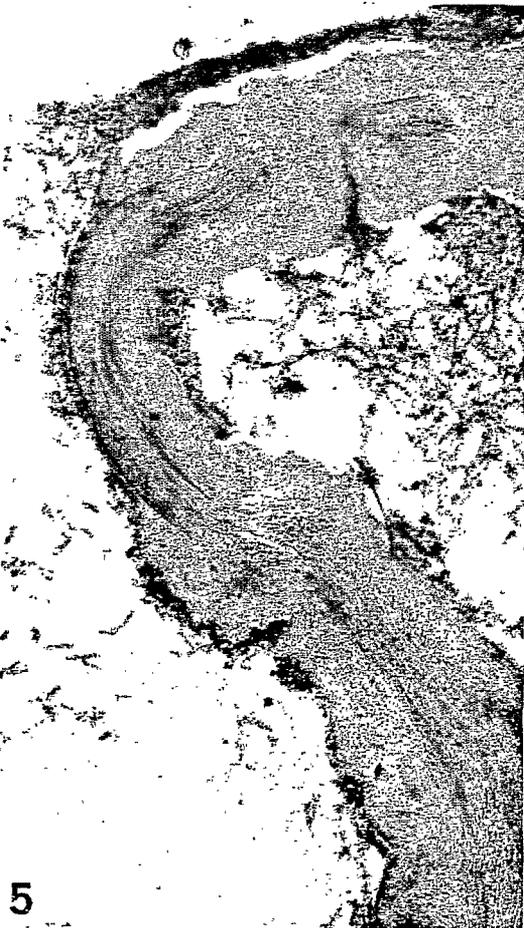
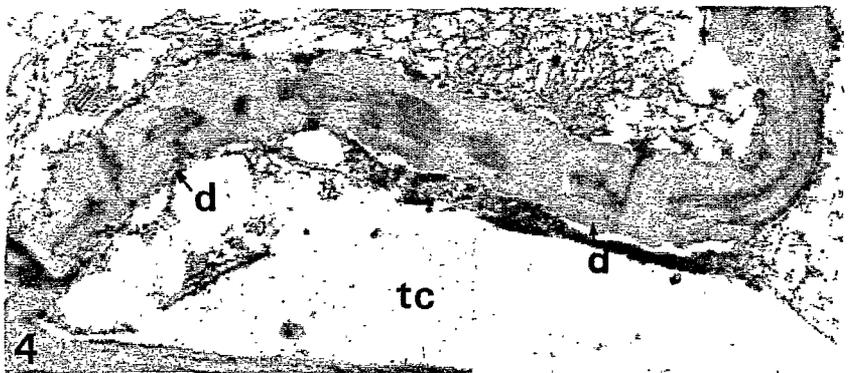
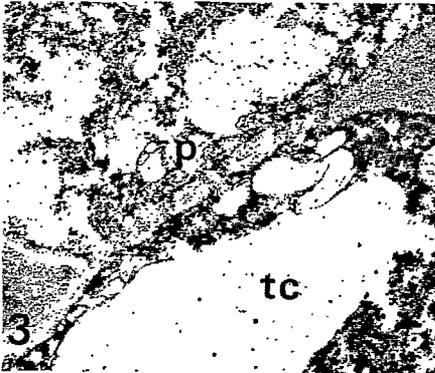
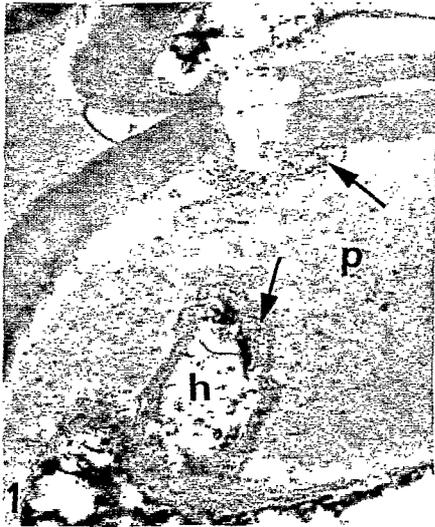


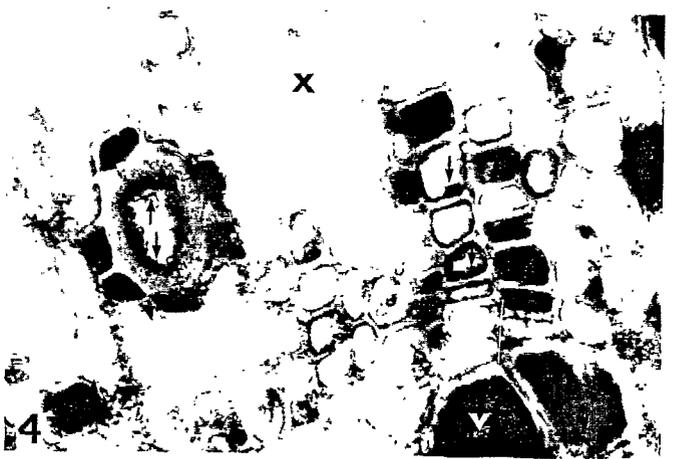
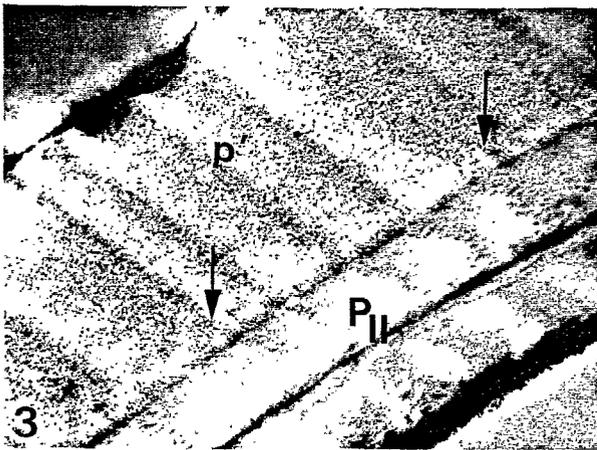
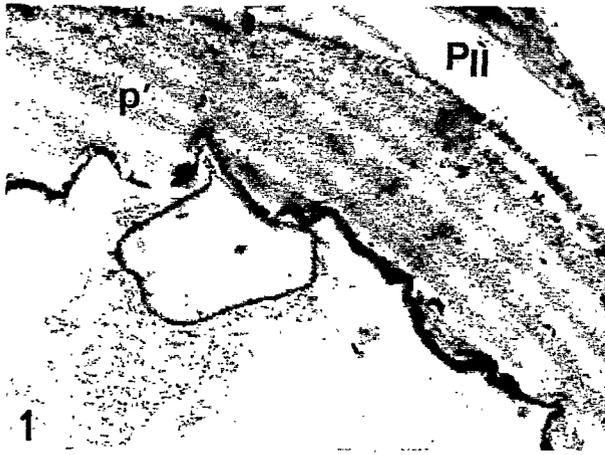
PLANCHE XXVIII

Glutaraldéhyde - tétroxyde d'osmium ; acétate d'uranyle - citrate de plomb (1 à 3)

Coupe réalisée au rasoir, non fixée : phloroglucine-HCl (4)

LES REACTIONS INTERVENANT AU COURS DE LA COLONISATION DES TISSUS

- 1 : néoformation d'une couche pariétale (p') flanquée contre la paroi secondaire (P<sub>II</sub>). Son contour interne est très irrégulier ; x 10400.
- 2 et 3 : cette nouvelle paroi (p') varie en épaisseur (2) et possède un aspect granuleux sauf au contact de la paroi secondaire (P<sub>II</sub>) où l'on distingue des fibres (3, flèches) ;
- 2 : x 16250 ;
- 3 : x 19500.
- 4 : MP; la couche pariétale déposée contre la paroi secondaire réagit aux tests des lignines (flèches) ; (v : vaisseau ; x : xylème) ; x 800.



## PLANCHE XXIX

Formol-alcool éthylique - acide acétique ; bleu de picroaniline - safranine.

### LES REACTIONS TARDIVES

- 1 : coupe transversale d'une racine d'Hévéea présentant une néogénèse tissulaire ; X 200. (MP)
- 2 : schéma général d'une coupe transversale d'une racine d'Hévéea présentant une néogénèse tissulaire ; X 25.

Néogénèse tissulaire réactionnelle ; X 200.

1. parenchyme médullaire ;
2. xylème natif ;
3. liber natif ;
4. tissus corticaux infectés ;
5. foyers cellulaires embryonnaires ;
6. rayons parenchymateux ;
7. liber néoformé ;
8. xylème néoformé ;
9. rhizomorphe ;
10. lenticelle ;

Le néocambium (nc) est initié à partir de l'ancien (flèche).

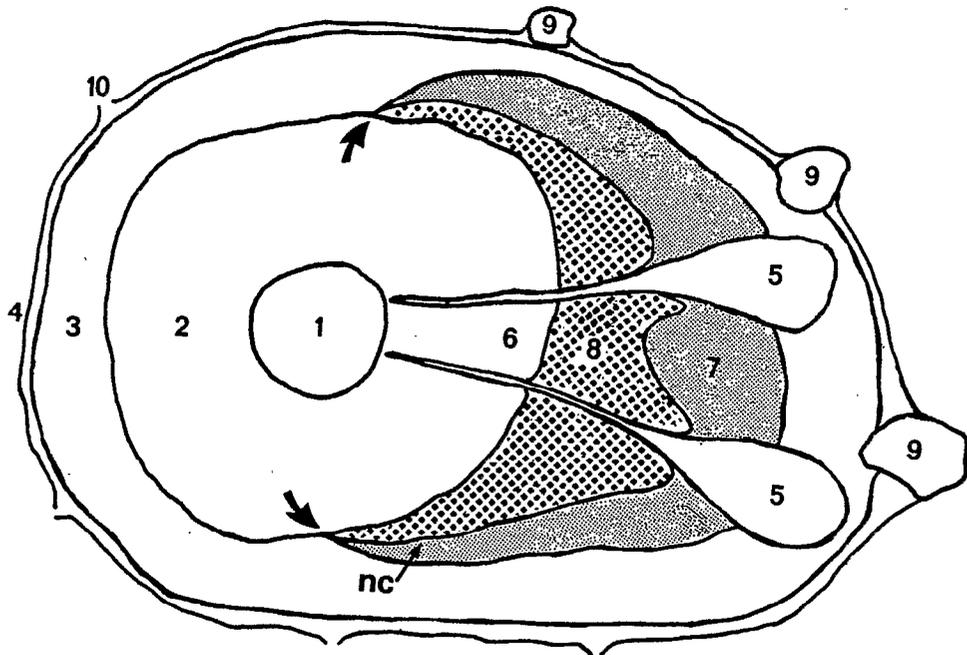
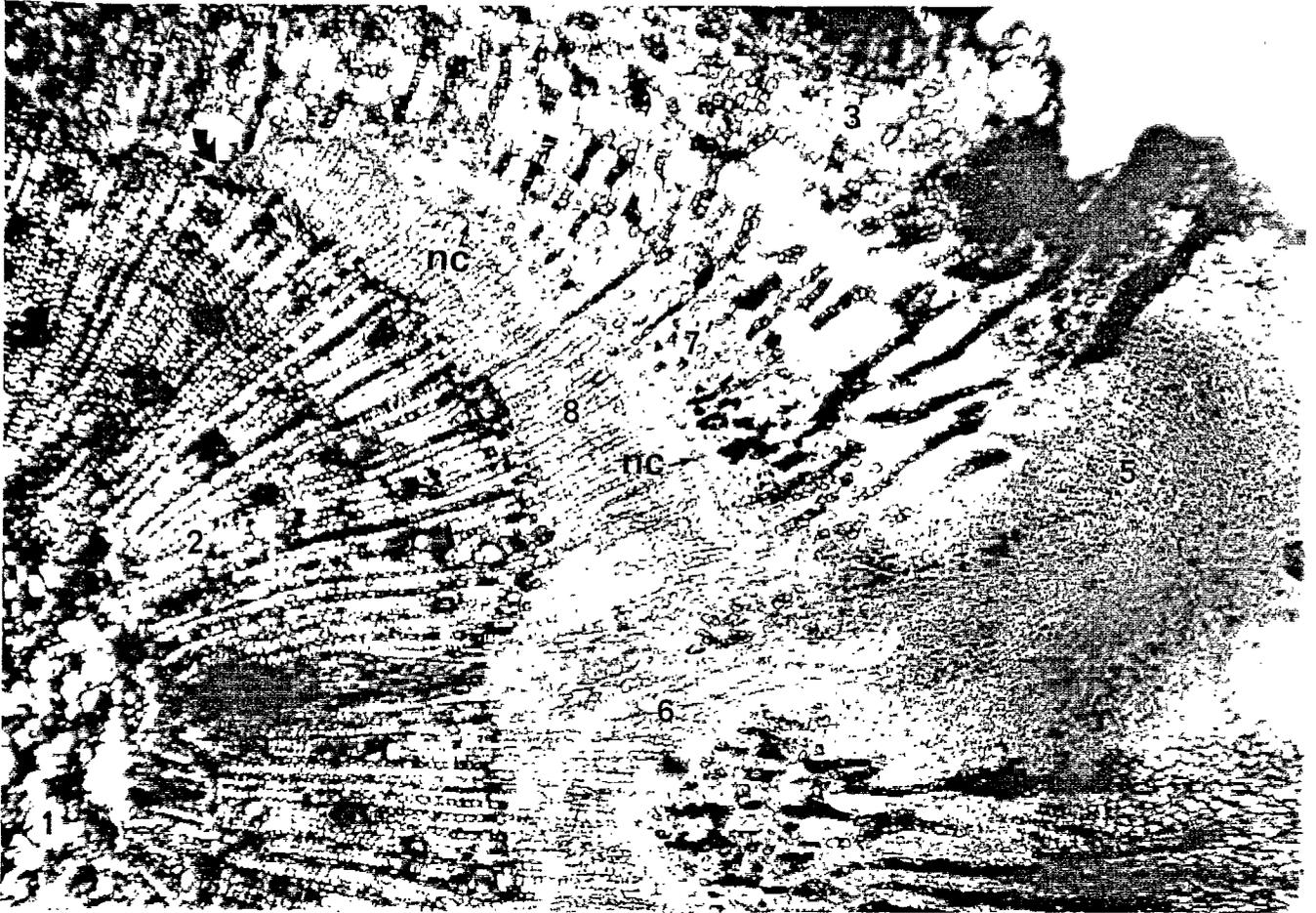
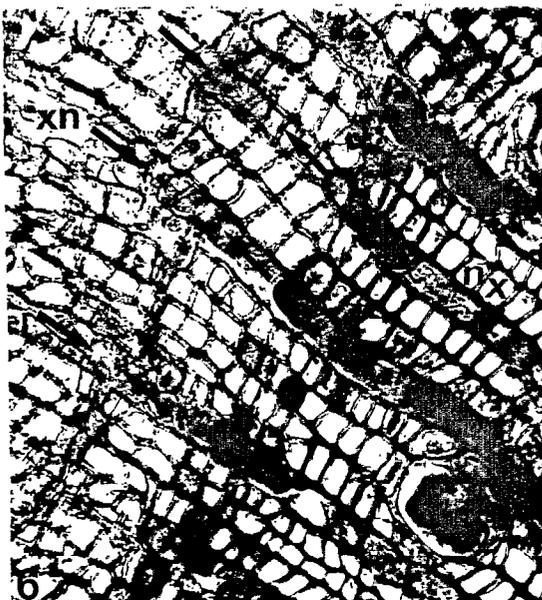
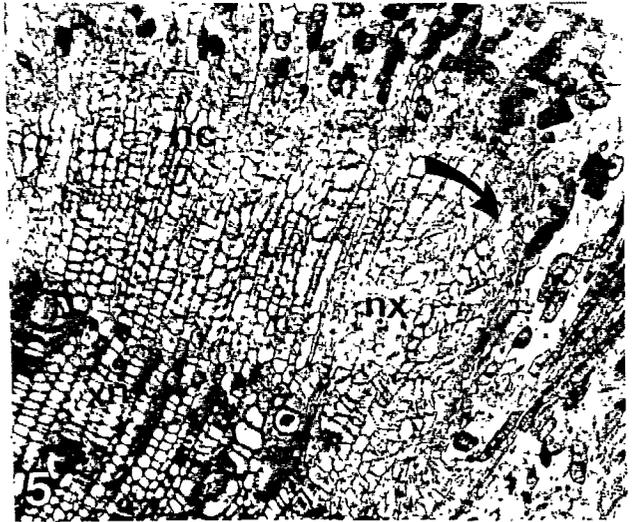
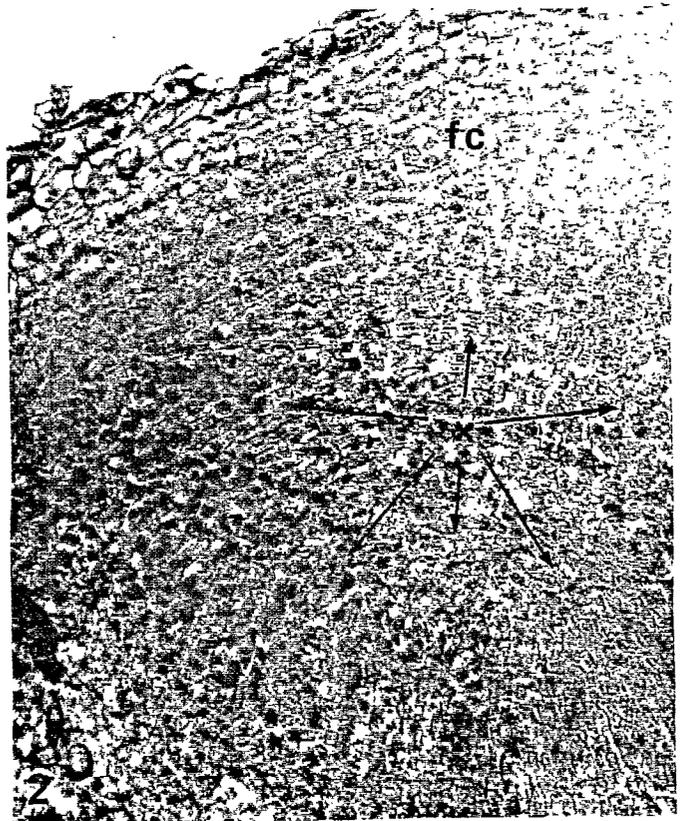


PLANCHE XXX

Formol-alcool éthylique - acide acétique ; bleu de picroaniline - safranine (1 à 7)

LES REACTIONS TARDIVES (MICROSCOPIE PHOTONIQUE)

- 1 : initiation de foyers cellulaires (fc) à partir de rayons parenchymateux (flèche) ; (nc : néocambium ; xn : xylème néoformé) ; x 500.
- 2 : nature méristématique des foyers cellulaires (fc) ; quelques cellules (\*) semblent organiser l'ensemble du foyer (flèches) ; x 500.
- 3 : les cellules de ces foyers cellulaires ont un cytoplasme dense (c) et un noyau volumineux (n) ; x 1250.
- 4 : le néoxylème est constitué de cellules typiques dont les parois épaisses sont abondamment garnies de ponctuations (flèches) ; x 320.
- 5 : le néocambium (nc) s'invagine au contact des rayons (flèche) qui initient les foyers cellulaires ; (nx: néoxylème ; xn : xylème natif) ; x 320.
- 6 : continuité (flèches) entre les rayons du néoxylème (nx) et ceux du xylème natif (xn) ; x 800.
- 7 : le néocambium (nc) différencie de part et d'autre un néoxylème (nx) et un néolibér (nl) ; x 320.



## RESUME

Les Basidiomycètes Polyporacées, *Rigidoporus lignosus* et *Phellinus noxius*, respectivement agent du pourridié blanc et agent du pourridié brun, provoquent des pourritures graves du système racinaire de l'arbre à caoutchouc, *Hevea brasiliensis*. Une étude fine des interactions hôte-parasite nécessite, avant tout, un strict contrôle de l'infection. Le chapitre premier décrit la réalisation, en conditions contrôlées, d'infections artificielles de jeunes Hévéa (clone GT1) par ces champignons (respectivement souches 1 et 4). L'acquisition de cet outil a favorisé les recherches histo-cytologiques de ces maladies. De ce fait, les modalités de l'agression de l'Hévéa par *R. lignosus* et *P. noxius*, exposées dans le second chapitre, sont élucidées tant au plan de la colonisation des tissus racinaires qu'au niveau de la désorganisation des structures hôtes. L'observation microscopique révèle la dégradation de l'ensemble des constituants des parois cellulaires par chaque parasite, de même que la déstabilisation du réseau laticifère causant la coagulation interne du caoutchouc. L'Hévéa répond cependant à ces attaques parasitaires par la mise en place de réactions de défense, initiées tout au long du processus infectieux. La plus remarquable, outre les phénomènes de lignification, de stimulation de l'activité cambiale ou de dépôts de callose, consiste en la différenciation de nouveaux tissus, épargnés par l'infection. La description de ces réactions ainsi que la discussion au sujet de leur rôle dans les interactions hôte-parasite sont rapportées dans le troisième chapitre.

## ABSTRACT

*Rigidoporus lignosus* and *Phellinus noxius*, are two Basidiomycetous soil root-rotting fungi causing severe damages in *Hevea brasiliensis* plantations. Host-parasite interactions were investigated at cellular level on infected plants. The first part of this paper deals with artificial inoculations on rubber-trees under controlled conditions while the second part contains microscopical observations on host aggression by each of these fungi, focusing on different stages of infection process ranging from root colonization to degradation of cell components. Major results concern penetration of hyphae, cell wall alterations and latex coagulation. Host defense is described in the third part of this presentation. Besides lignification, stimulation of cambium activity, wall thickening and callose deposition, the most remarkable reaction differentiated by *H. brasiliensis* is tissue neogenesis leading to compartmentalization of the infected root. The role of these reactions in pathogenesis is also discussed in this chapter.