

N° d'ordre

THESE

présentée à

L'UER DES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA TERRE DE L'UNIVERSITE LOUIS
PASTEUR DE STRASBOURG

pour obtenir

LE GRADE DE DOCTEUR ES SCIENCES

PAR

JEAN-PAUL GEIGER

MAITRE DE RECHERCHES DE L'ORSTOM

ASPECTS PHYSIOLOGIQUES ET BIOCHIMIQUES DES INTERACTIONS
HOTE-PARASITE DANS LE CAS D'*HEVEA BRASILIENSIS* ET DE
DEUX PARASITES RACINAIRES: *RIGIDOPORUS LIGNOSUS* ET
PHELLINUS NOXIUS.

Soutenu le 20 décembre 1985 devant la Commission d'Examen:

M.	J.H.	WEIL	Président
M.	J.	CHEVAUGEON	
M.	B.	FRITIG	
M.	L.	HIRTH	Examineurs
M.	B.	MONTIES	
M.	A.	RAVISE	



LISTE DES PROFESSEURS, MAITRES DE CONFÉRENCES
DIRECTEURS ET MAITRES DE RECHERCHE C.N.R.S. ET I.N.S.E.R.M.

Président	Professeur	H.DURANTON
Vice-Présidents	Professeur	M.ROOS
	Professeur	C.CONRAUX
	M.de Rech.	A.CORET
Présidents Honoraires	Professeur	G.OURISSON
	Professeur	P.KARLI
	Professeur	F.MARCOUX
Secrétaire Général	Monsieur	G.KIEHL

U.E.R. DES SCIENCES MÉDICALES

U.E.R. des Sciences Médicales : Directeur Jean-Marie MANTZ
U.E.R. des Sciences Biomédicales : Directeur Jean SCHWARTZ

Doyens honoraires : J.CALLOT - J.CLAVERT - F ISCH - M.DORNER

Professeurs honoraires : A BASSET - P.BEYER - P. BUCK - J.CALLOT - J.CLAVERT - E.FORSTER - G.GREINER - A.JUNG - T.KAMMERER - P.MANDEL - H.METZGER - A.SCHMIDT - F.ROHMER - E.SCHNEEGANS - J.SEROR - F.STÉPHAN - J.VEDRINE - R.VOEGTLIN - J.WARTER - G.WINCKLER.

Professeurs :

M ADLOFF	Chirurgie générale	J.HERAN	Méd et Chir.expérim.et comparée	B METZ	Physiologie appliquée
N APROSIO	Anatomie et Organogénèse	L.HOLLENOER	Chirurgie digestive et générale	R MINCK	Bactériol. Virol. Immunol. gén
C ARON	Histologie	J.L.IMBS	Pharmacologie	G MORAND	Chirurgie thoracique
L ASCH	Rhumatologie	M IMLEH	Médecine interne	F.OBERLING	Maladies du sang
A BERTZENSCHLAGER	Anatomie pathologique	F ISCH	Rééducation fonctionnelle	J.C OTTENI	Anesthésiologie
M.BIENTZ	Epidémiologie et prévention	L ISRAEL	Psychiatrie d'Adultes	E PHILIPPE	Anatomie pathologique
P BLOCH	Radiologie	D.JAECK	Chirurgie générale	R RENAUD	Gynécologie et obstétrique
R BLOCH	Pharmacologie	H.JAHN	Néphrologie	P REVILLE	Endocrinol. métabol. et Nutrit
R BUCKEL	Hépatologie, Gastro-entérologie	M.JESSEL	Rééducation fonctionnelle	P REYS	Chir.gén. Hôp.L.Pasteur - Colmar
C BOLLACK	Urologie	J.JUIF	Pédiatrie et Puériculture	J BITTER	Gynécologie et Obstétrique
A BRIHI	Ophthalmologie	P KARLI	Neurophysiologie	E PUJEGEL	Pneumologie phthisiologie
A BRONNER	Clinique ophtalmologique	B KELLER	Clin gynécol. et obstétricale	J.V RUCH	Biologie médicale
F BUCHHEIT	Neurochirurgie	F.KEMPF	Radiologie	Y RUMPLER	Embryol. et Morphol générale
G BURGHARD	Clin et Prophylaxie de la tubercul	I.KEMPF	Orthopédie et Traumatologie	A.SACREZ	Cardiologie
P CHAMBRON	Biophysique	T T KIEN	Parasitologie	P SAUVAGE	Chirurgie infantile
J CHAMBRON	Physique biologique	R KIENY	Pathol. et Clin. Sémiol. chir	G SAVA	Chirurgie générale
M CHAMPY	Stomatologie	A.KIRN	Virologie	G SCHAFF	Physiologie
A CHAUMONT	Méd Légale et Méd.Sociale	J.G.KORITKE	Anatomie normale	E.SCHVINGT	Clin chir.orthop. et traumat.d'adultes
M COLLARD	Clinique neurologique	M.KREMER	Parasitol. et pathologie tropicale	J.SCHWARTZ	Pharmacol.et Médecine expérimentale
C CONRAUX	Oto-Rhino-Laryngologie	D.KURTZ	Neurologie	A SIBILLY	Clinique chirurgicale A
P DELLENBACH	Gynécologie et Obstétrique	G.LANG	Orthop. et traumatologie	H.SICK	Anatomie et organogénèse
M DORNER	Clin. Médicale B	Y.LE GAL	Anatomie pathologique	L.SINGER	Clinique psychiatrique d'Adultes
R.EBTINGER	Psychiatrie infantile	J.M.LEVY	Pédiatrie, Génétique médicale	D STORCK	Clinique médicale A
M FABRE	Histologie	J.M.MANTZ	Réanimation médicale	J.D.TEMPE	Réanimation médicale
L FINCKER	Clin. médicale B Cardiologie	F.MARCOUX	Médecins du travail	G.VINCENDON	Biophysique
R GANDAR	Clin. gynécol. et obstétricale	J.MARESCAUX	Histologie	A.WACKENHEIM	Radiologie
P.GAUTHIER-LAFAYE	Anesthésiologie	Ch.MARX	Physiologie	J.P.WALTER	Radiologie
J.P.GERHARD	Ophthalmologie	S.MAYER	Hématologie	P.WARTER	Radiologie
J.GRENIER	Chirurgie générale	J.MEHL	Médecine du travail	J.P.WEILL	Gastro-entérol.et hydrol.thérapeutique
E.GROSSHANS	Clin.dermatol.et Syphiligraphique	G.METHLIN	Physique biologique	D.WILLARD	Pédiatrie, Génétique Médicale
P HABEREY	Physiologie			J.P WITZ	Chirurgie thoracique

Professeurs conventionnés : G LECLERC (Chim. org) - A.PETROVIC (Physiologie)

Maitres de Conférences Agrégés :

S BABIN	Orthopédie et Traumatologie	A.JAEGER	Réanimation médicale	J.M MOSSARD	Cardiologie et maladies vasculaires
P BAREISS	Médecine interne	P.KEHR	Orthopédie et traumatologie	G.OBERT	Virologie
P BOURJAT	Radiologie	R.KEILING	Cancérologie	M PATRIS	Psychiatrie d'adultes
C.BRECHENMACHER	Cardiologie	J.KEMPF	Biologie	G PAULI	Pneumologie phthisiologie
J.M.BROGARD	Médecine interne	G KLOTZ	Oto-rhino-laryngologique	M PINGET	Endocrinologie et maladies métabol
C BURSZTEJN	Pédo-psychiatrie	F.KUNZMANN	Médecine interne	M.ROOS	Histologie
J CINQUALBRE	Urologie	J.M.LANG	Maladies du sang	J.P.SCHIEBER	Physiologie
A.CONSTANTINESCO	Physique Biologique	D.MAITROT	Neurochirurgie	G.SCHLAEDER	Gynécologie et obstétrique
J.P.DUPEYRON	Anesthésiologie	J.L.MANDEL	Biophysique	J L SCHLIENGER	Médecine interne
B EISENMANN	Chirurgie cardio-vasculaire	C.MARESCAUX	Neurologie	C.STOLL	Pédiatrie, Génétique médicale
J FLAMENT	Ophthalmologie	J.MARESCAUX	Chirurgie générale	J.TONGIO	Radiologie
J GEISERT	Pédiatrie, Génétique médicale	J MARK	Biophysique	J.M.WARTER	Neurologie
P GERLINGER	Embryologie	J.MESSEH	Pédiatrie, génétique médicale	A WILK	Stomatologie
G HAUPTMANN	Immunologie (opt. biol.)	C.MEYER	Chirurgie générale		
E HEID	Dermatologie et Allergie	H.MONTFIL	Bactériologie		

Maître de Conférences Associé : J.H.JAEGER (Orthopédie).

Maîtres de Conférences Conventonnés : A.MALAN (Physiologie respiratoire) - J.J.VOGT (Thermophysologie)

Directeurs de Recherche : M.JACOB* (Biochimie) - A.PETROVIC* (Physiologie).

Maîtres de recherche :

A.M.AUBERTIN* Virologie
D.AUNIS* Neurochimie
J.P.CAZENAVE* Hémostase
A.EBEL* Neurochimie
J.M.EGLY* Biologie moléculaire
L.FREYSZ* Neurochimie
M.GAUTHIERIE* Thermologie biomédicale
G.GOMBOS* Neurochimie

K.HAFFEN-STENGER* Endocrinologie
G.LECLERC* Chimie organique
G.REBEL* Neurochimie
R.RECHENMANN* Biophys. des rayonnements
L.SARLIEVE* Neurochimie
M.SENSENBRENNER* Neurochimie
J.STEVENIN* Biologie moléc.et cellulaire

C.STOCK-DAMGE* Physiologie
J.VELLY* Pharmacologie
M.VERGNES* Neurophysiologie
N.VIRMAUX-COLIN* Neurochimie
J.J.VOGT* Thermophysologie
A.WAKSMAN* Neurochimie

* I.N.S.E.R.M. † C.N.R.S.

U.E.R. D'ODONTOLOGIE

Directeur Robert FRANK

Professeurs :

M.DOCO Odontologie conservatrice, endodontie
R.FRANK Sciences biologiques (Biochimie), Immunologie, Histologie, Embryologie, Génétique,
P.KLEWANSKY Anatomie Pathologique, Bactériologie, Pharmacologie, Parodontologie

J.LITZLER Prothèses (prothèse conjointe, adjointe partielle, prothèse complète, prothèse maxillo-faciale)
J.L.LACOSTE Orthopédie dento-faciale

Professeurs de premier grade :

C.ALLEMANN Odontologie conserv., endodontie
M.BASTIAN Prothèses (prothèse conjointe, adj. partielle, prothèse complète, prothèse maxillo-faciale)
C.BOLENDER Orthopédie dento-faciale
A.COMTE Odontologie conserv., endodontie

R.HAAG Chirurgie buccale, pathol. et thérap., Anesthésiologie et réanimation
M.LANGER Prothèses (prothèse conjointe, adj. partielle, prothèse complète, prothèse maxillo-faciale)
M.LEIZE idem.

P.NICOLAS Chirurgie buccale, pathol. et thérap., Anesthésiologie et réanimation
J.J.ROTH Parodontologie
A.SCHLIENGER Prothèses (prothèse conjointe, adjointe partielle, prothèse complète, prothèse maxillo-faciale)
J.SOMMERMATER Pédodontie

Professeurs de deuxième grade :

P.CAHEN Prévention, épidémiologie, économie de la Santé, Odontologie légale
J.P.CHARLIER Orthopédie dento-faciale

B.KAESS Chirurgie buccale, pathol. et thérap., Anesthésiologie et réanimation
H.TENENBAUM Parodontologie

Maître de recherche I.N.S.E.R.M. : A.BELCOURT (Odontologie)

U.E.R. DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES

Directeur Alexis GAIRARD

Doyens honoraires : P.DUQUENOIS - M.HASSELMANN - G.DIRHEIMER - P.METAIS.

Professeurs honoraires : P.CORDIER - J.P.EBEL - G.GAZET du CHATELIER - M.HASSELMANN - P.JAEGER - J.SCHREIBER

Professeurs :

R.ANTON Pharmacognosie
J.J.BEFORT Biologie cellulaire
R.CARBIENER Botanique
G.DIRHEIMER Toxicologie
G.FERARD Biochimie
J.L.FRESLON Pharmacodynamie
A.GAIRARD Physiologie
D.GERARD Physique et biophysique
M.GOELDNER Chimie organique
C.HASSELMANN Chimie analytique

L.JUNG Pharmacie chimique
J.C.KOFFEL Pharmacie chimique
H.LAMI Mathématiques
Y.LANDRY Pharmacologie
C.LAPP Chimie générale et minérale
P.LAUGEL Chimie analytique
G.LAUSTRIAT Physique
A.LUGNIER Toxicologie
J.MALGRAS Immunologie

C.MATHIS Pharmacie galénique
P.METAIS Biochimie
B.PESSON Parasitologie
P.POINDRON Virologie
A.STAHL Biochimie pharmaceutique
A.STAMM Pharmacie galénique
J.C.STOCLET Pharmacodynamie
D.VIDON Bactériologie
C.G.WERMUTH Chimie organique

Professeur émérite : J.SCHREIBER (Chimie organique).

Chargé de cours : M.KRISTENSEN (Hygiène, nutrition et diététique).

Professeur associé : R.MILLER (Pharmacodynamie).

Professeur conventionné : R.HEINTZ (Pharmacocinétique) - B.ROTH-SCHECHTER (Pharmacodynamie).

Maître de recherche : I.N.S.E.R.M. : J.BIETH (Enzymologie).

U.E.R. DES SCIENCES HUMAINES

U.E.R. de Géographie

: Directeur Henri VOGT

U.E.R. des Sciences du Comportement et de l'Environnement

: Directeur Philippe ROPARTZ

Professeurs honoraires : E.JUILLARD - R.RAYNAL.

Professeurs :

J.M.AVENARD Géographie
L.LEGRAND Sciences de l'éducation
P.LIMOZIN Géographie
P.MICHEL Géographie

A.MOLES Psychologie sociale
H.NONN Géographie
H.REYMOND Géographie

A.TABOURET-KELLER Psychologie
M.TARDY Psycho-pédagogie
J.TRICART Géographie
H.VOGT Géographie physique

Maître de Conférences Conventonnés : J.P.BAUER (Psycho-pédagogie).

Directeur de recherche : C.N.R.S. : S.RIMBERT (Géographie).

Maître de recherche : C.N.R.S. : J.F.MARTIN (Géographie).

U.E.R. DES SCIENCES ÉCONOMIQUES

Directeur Michel DEVOLUY (Chargé de l'intérim)

Doyens honoraires : P.CHAMLEY - J.P.FITOUSSI - R.DOS SANTOS FERREIRA - J.L.GAFFARD.

Professeurs honoraires : A.CHABERT - P.CHAMLEY.

Professeurs :

P.ARTZNER	Mathématiques	R.DOS SANTOS FERREIRA	Sciences Economiques	J.J.OBRECHT	Sciences de gestion
F.BILGER	Sciences Economiques	J.J.DURAND	Sciences Economiques	P.PONCET	Sciences de gestion
P.COHNEDT	Sciences Economiques	G.KOENIG	Sciences Economiques	J.THEPOT	Sciences de gestion

Professeurs émérites : A.CHABERT (Sciences Economiques) - P.CHAMLEY (Sciences Economiques).

Professeurs associés : W.HILDENBRAND - J.P.VIAL.

Professeur conventionné : R.UHRICH (Ec.rég. et europ.).

Chargés de conférences : J.ARROUS - R.ERBES.

U.E.R. DES SCIENCES EXACTES

Mathématiques	: Directeur Daniel BERNARD
Sciences de la Matière	: Directeur Henri BENOIT
Sciences de la Vie et de la Terre	: Directeur Thierry JUTEAU
Sciences du Comportement et de l'Environnement	: Directeur Philippe ROPARTZ
Ecole d'Application des Hauts Polymères	: Directeur Morand LAMBLA
Ecole Nationale Supérieure de Chimie	: Directeur Marc DAIRE
Observatoire	: Directeur Alphonse FLORSCH
Physique du Globe	: Directeur Roland SCHLICH
Ecole Nationale Supérieure de Physique	: Directeur Gilbert SUTTER
I.U.T.	: Directeur Michel GENEVAUX

Professeurs honoraires : P.LACROUTE - J.H.VIVIEN - G.MILLOT.

Professeurs honoraires : J.BRENET - Mme M.BRINI - J.BYE - H.CARTAN - C.CHABAUTY - A.CHRETIEN - A.DELUZARCHE - J.DENY - Mme A.GAGNIEU - Mme S.GILLET - G.GLAESER - S.GORODETZKY - L.HIRTH - R.HOCART - P.JOLY - P.LACROUTE - R.LECOLAZET - G.LEMEE - P.L'HERITIER - A.LICHTNEROWICZ - A.MAILLARD - G.MILLOT - G.MILLON - G.REEB - A.ROCHE - R.ROHMER - J.P.ROTHE - L.SACKMANN - Ch.SAIRON - H.SAUCIER - F.SCHALLER - F.STUTINSKY - H.VILLAT - J.H.VIVIEN - Et.WOLFF - J.WUCHER - B.WURTZ.

Professeurs :

A.ACKER	Astronomie	P.FELTZ	Physiologie Animale	J.MARTINET	Mathématiques
J.P.ADLOFF	Chimie nucléaire	X.FERNIQUE	Mathématiques	P.MIALHE	Physiologie animale
R.AMBRUSTER	Physique	J.G.FISCHER	Chimie	A.MICHARD	Géologie
P.AZNER	Mathématiques	D.FOATA	Mathématiques	M.MIGNOTTE	Informatic
V.A.ANISSIAN	Analyse supérieure	E.FOLLENIUS	Zoologie	P.MIRABEL	Chimie
G.BARBANCON	Mathématiques	J.J.FRIED	Mécanique des Fluides	G.MONSonego	Physique théorique
F.BECKER	Physique mathématique	D.FROELICH	Chimie générale et chimie phys.	B.MORIN	Mathématiques I
N.BEFORT	Biochimie	A.FUCHS	Mécanique rationnelle	P.NANQOULOS(dét.)	Probabilités et Statistiques
G.BELLIARD	Botanique	J.C.GALL	Géologie	B.OBRECHT	Mécanique
C.BENEZRA	Dermato chimie	A.GALLMANN	Physique	J.OSBORN	Chimie
D.BENNEQUIN	Mathématiques	F.GAUTIER	Physique	E.OSTERTAG	Electr. et Electrotechnique
H.BENOIT	Physicochimie macromol.	R.GERARD	Mathématiques	L.OTTEN	Pathologie moléculaire végétale
P.BENYENISTE	Physiologie végétale	A.GIRAUDOUAU	Chimie physique (IUT)	G.OURISSON	Chimie
D.BERNARD	Méth.math.de la physique	C.GOOBILLON	Mathématiques	J.M.FAJLUS	Chimie générale
J.C.BERNIER	Chimie générale	A.GOLTZENE	Optique, phys.atom et moléc.	J.P.RAMIS	Mathématiques générales
J.BONNIN	Géophysique interne	M.GOUNOT	phys. du sol et cristalllographie	P.RICHARD	Physiologie animale
Y.BOULANGER	Biochimie	M.GROSMANN	Botanique	J.RIEHL	Chimie
J.F.BOUTOT	Mathématiques	M.GROSS	Physique	P.RIMELIN	Chimie organique (IUT)
J.BROSSAS	Chimie macromolécul.	Y.GUEGUEN	Chimie physique	C.ROBERT	Physique
R.BROUILLARD	Chimie org et chimie analyt.	C.HIRTH	Géophysique interne	P.ROPARTZ	Psycho-physiologie
C.BURGGRAF	Minéralogie	J.C.HUBERT	Chimie organique	J.ROUX	Physique
H.BURNAGE	Mécanique des Fluides	B.JARRY	Microbiologie	G.SCHIFFMANN	Mathématiques
M.CARA	Géophysique interne	C.JASCHEK	Biochimie génétique	A.SCHMITT	Physique
H.CARAYOL	Mathématiques	G.JONARD	Astronomie	P.SCHMITT	Psycho-physiol.et physiol.du comp.
R.CERF	Physique générale	J.P.JOUANOLOU(dét.)	Virologie	J.P.SCHWING	Physique
P.CHARTIER	Chimie	F.JUNDT	Mathématiques	M.J.SCHWING	Chimie
P.CHEVALLIER	Physique	T.JUTEAU	Phys nucl et corpusc.et théo.phys.	J.C.SENS	Phys.nucl et corpusc.et théor.phys.
A.CLAUSS	Chimie	C.KEDINGER	Minéralogie	M.SIESKIND	Physique
A.COCHÉ	Physique nucléaire	A.KIENEMANN	Biochimie	G.SOLLADIE	Chimie organique
M.DAIRE	Chim phys.indus.et Sc.des Mat.	R.KIRSCH	Chimie appl. et génie chimique	J.SOMMER	Chimie appliquée
H.DANAN	Phys atom et phys du solide	F.LACROUTE	Zoologie	S.SORIN	Mathématiques
E.DANIEL	Physique expérimentale	J.C.LAFON	Biologie végétale	G.SUTTER	Physique électronique
M.DAUNE	Biophysique	A.M.LAMBERT	Informatic appliquée	C.TANIELAN	Chimie appl et chimie des matériaux
J.DEHAND	Chimie générale	M.LAMBLA	Biologie	Y.TARDY	Géologie
J.DEMUYNCK	Chimie organique	G.LEBEURIER	Chimie générale	J.TERRISSE	Chimie
J.P.DESCLÉS	Inform.fond et appl.(Univ.II)	J.M.LEHN	Microbiologie	J.J.THIEBOLD	Biologie animale
J.F.DUFOURO	Inform.fond.et appl.	J.L.LEIBENGUTH	Chimie (Collège de France)	D.VIAUD	Mathématiques
G.DUROYER de	Géologie	H.LEISMANN	Chimie appl et chimie des matér.	R.VOLTZ	Physique théorique
SEGONZAC (dét.)		J.LEITE-LOPES	Chimie	J.H.WEIL	Biochimie
H.DURANTON	Botanique	P.LEMOINE	Phys nucl. et corpusculaire	G.WEILL	Physique
J.P.EBEL	Biochimie	M.LEROY	Chimie physique (IUT)	R.WEISS	Chimie
J.P.EBERHART	Minéralogie	J.C.LIONS	Chimie	P.L.WENDEL	Physique
B.EHRESMANN	Biochimie	F.LOOR	Zoologie et Ecologie	B.WILL	Psycho-physiologie
V.EPN	Physique	J.LUCAS	Immunologie	C.WINTER	Chimie
J.FARAUT	Mathématiques	D.MAGNAC	Géologie	C.WIPPLER	Physicoch.des Hauts Polymères
P.FEDERLIN	Chimie		Physique		

Professeurs émérites : G.GLAESER (Math.) - L.HIRTH (Microbiologie) - R.LECOLAZET (Phys du Globe) - G.MILLOT (Géologie Paléontologie).

Professeur adjoint : J.SITTLER (Géologie).

Professeurs associés :

Z.AKASU	Optique physique	J.GROVES	Chimie minérale	L.MEZZA-BASSO	Biochimie
K.BHATT	Physique nucléaire théorique	T.HOFMOKL	Physique nucléaire et corpusculaire	J.L.MORAN-LOPEZ	Physique
P.BIRD	Chimie minérale	A.KORANYI	Mathématiques	I.SATAKE	Mathématiques
H.BJELKHAGEN	Electronique et Electrotechnique	G.LETTA	Mathématiques	H.SCHMIED	Physique
C.CAMACHO	Mathématiques	A.MELFI	Géochimie	H.UMEMURA	Mathématiques
P.CARSKY	Chimie	P.MEYRUEIS	Robotique productive	H.YEH	Géochimie
M.CONSTANTIN	Chimie organique				

Professeurs conventionnés : P.DEJOURS (Physiol.respir.) - Y.NAKATANI (Chimie) - P.SMIGIELSKI (Physique).

Astronomes adjoints : A.FLORSCH - A.FRESNEAU (Idet.) - M.JASCHEK.

Physiciens adjoints (Physique du Globe) : P.HOANG TRONG (Géophysique int.) - R.MONTIGNY (Géophysique int.).

Directeurs de recherche C.N.R.S. :

P.ALBRECHT	Chimie	J.LAHAYE	Coordination et catalyse	A.SKOUlios	Physicochimie macromoléculaire
J.F.BIELLMANN	Chimie	G.MAIRE	Chimie	M.VAN REGENMORTEL	Virologie
S.CANDAU	Physique	J.MARCHAL	Physicochimie macromoléculaire	R.VAROQUI	Physicochimie macromoléculaire
P.DEJOURS	Physiologie respiratoire	A.J.P.MEYER	Physique des solides	A.VEILLARD	Chimie moléculaire
M.FRANCK-NEUMANN	Chimie organique	P.A.MEYER	Mathématiques	R.ZANA	Physicochimie macromoléculaire
J.HOFFMANN	Biochimie animale	A.PORTE	Biologie cellulaire	W.S.ZHOU	Astr. environnement planétaire
A.KNIPPER	Physique nucl. et corpusculaire	P.REMPF	Physicochimie macromoléculaire	A.ZUKER	Physique théorique
A.KOVACS	Physicochimie macromoléculaire	R.SCHLICH	Géophysique marine		
		P.SIFFERT	Physique nucl. et corpusculaire		

Maîtres de recherche C.N.R.S. :

J.Ch.ABBE	Physicochimie des interact. et interfaces	H.GIRARD	Physiologie respiratoire	L.PINCK	Virologie
J.J.ANDRE	Physicochimie macromoléculaire	P.GRAMAIN	Physicochimie macromoléculaire	P.POIX	Chimie
E.ASLANIDES	Physique nucléaire et corpusculaire	J.B.GRUN	Physique	J.POUYET	Biophysique
H.BARREAU	Philo., Epistémol., Hist. des Sc. et Tech.	H.GUILLEY	Biologie, Biologie végétale	B.REES	Chimie
F.BECK	Physique nucléaire et corpusculaire	F.HAAS	Physique nucléaire et corpusculaire	J.REINBOLT	Biochimie
G.BECK	Biochimie	J.HERZ	Physicochimie macromoléculaire	P.REMY	Biochimie
J.P.BECK	Physiologie	F.HIBOU	Physique nucléaire	K.RICHARDS	Virologie
J.P.BEHR	Chimie	L.HILAIRE	Chimie physique	J.RICHERT	Physique nucléaire théorique
M.BENARD	Chimie quantique	G.JENNER	Chimie	J.RINGEISEN	Physique
H.BRAUN	Physique nucléaire et corpusculaire	G.KAUFMANN	Chimie	O.ROHFRITSCH	Phyтомorphogénèse
P.BRAUNSTEIN	Chimie	G.KEITH	Biochimie	J.P.ROTH (Dir. Inst. Rech.)	Physicochimie macromoléculaire
G.BURKARD	Biochimie végétale	H.KESSLER	Matériaux inorganiques	J.P.SAUVAGE	Chimie physique
M.C.CAOEVILLE	Physique des solides	J.P.KINTZINGER	Chimie	R.SCHANTZ	Physiologie végétale
H.CALLOT	Chimie	B.KOCH	Physiologie	F.SCHEIBLING	Physique nucléaire et corpusculaire
F.CANDAU	Physicochimie macromoléculaire	E.KOCHANSKI	Struct. et dynam. molécul.	F.SCHUBER	Chimie organique
J.CHEVELLIER	Physique nucléaire et corpusculaire	M.LAGUEUX	Chimie de coordination	M.SCHULZ	Physique nucléaire et corpusculaire
M.R.CHEVALLIER	Biologie cellulaire	B.LANG	Bio organismes/dév.	C.SCHWAB	Physique
N.CLAUER	Géologie	J.LANG	Cristallographie	O.SCRIVENER	Sc. phys. pour l'ingénieur
J.P.COFFIN	Physique nucléaire et corpusculaire	P.LAURENT	Physicochimie macromoléculaire	R.SELTZ	Physique nucléaire et corpusculaire
A.CORET	Physique	C.LERAY	Physiol. comparée des régulations	B.SIFFERT	Coordination et catalyse
M.CROISSIAUX	Physique nucléaire et corpusculaire	R.LEVY	Physiol. comparée des régulations	P.SIMPSON	Bio organismes/dév.
E.CROUSE	Biochimie végétale	F.LEYENDECKER	Physique	C.SITTLER	Géologie
C.DECKER	Chimie théorique et macromoléc.	J.L.LODAY	Chimie	A.SOLLADIE	Chimie
D.DIDIER	Physique nucléaire et corpusculaire	B.LDTZ	Mathématiques	M.E.STOECKEL	Biol. des interactions cellulaires
J.DOUBINGER	Géologie	B.LUU	Physicochimie macromoléculaire	C.STRAZIELLE	Physicochimie macromoléculaire
F.DURST	Physiologie végétale	A.MALAN	Chimie organique	M.SUFFERT	Physique nucléaire et corpusculaire
R.EHRBURGER	Coordination et catalyse	E.MARCHAL	Physiologie respiratoire	J.C.THIERRY	Chimie
S.EL.KOMOSS	Physique	P.MARTINOTY	Physicochimie moléculaire et macromol.	K.TRAORE	Physicochimie atomique et ionique
J.FLECK	Virologie	J.C.MERDINGER	Sc. Physique pour l'ingénieur	J.P.VIVIEN	Physique nucléaire et corpusculaire
B.FRANCOIS	Physicochimie macromoléculaire	C.MIOSKOWSKI	Physique nucléaire	P.WAGNER	Physique nucléaire et corpusculaire
J.FRANCOIS	Physicochimie macromoléculaire	D.MORAS	Chimie	G.WALTER	Physique nucléaire et corpusculaire
E.FRANTA	Physicochimie moléculaire	T.MULLER	Physique nucléaire et corpusculaire	F.WEBER	Géologie
J.M.FRIEDT	Physicochimie des interact. et interfaces	G.MUNSCHY	Physique	J.P.WENIGER	Zoologie
B.FRITIG	Virologie	E.PAPIRER	Chimie théor. et macromol.	M.WESTPHAL	Géophysique
R.FUCHS	Biophysique	H.PAQUET	Géologie	J.C.WITTMANN	Chimie théor. et macromol.
J.C.JALIN	Physicochimie macromoléculaire	M.PATY	Physique nucléaire et corpusculaire	R.WOLFF	Biologie cellulaire
Y.GALLOT	Physicochimie macromoléculaire	P.PEVET	Zoologie	J.P.ZIELINGER	Chimie
J.GANGLOFF	Biochimie	C.PICOT	Physicochimie macromoléculaire	L.ZILLIOX	Physique
J.P.GERBER	Physique nucléaire et corpusculaire				Mécanique des Fluides
R.GIEGE	Biochimie				
C.GIGOT	Virologie				

A mon Epouse

A mes enfants

A mes Parents

Les recherches dont les résultats seront présentés ci-dessous, ont été effectués dans le cadre du programme "Pourridiés de l'Hévéa". Ce programme a toujours bénéficié du soutien de la part de l'ORSTOM et des Autorités de la Côte d'Ivoire. Que Monsieur le Ministre de l'Education Nationale et de la Recherche Scientifique de la Côte d'Ivoire et Monsieur le Directeur Général de l'ORSTOM me permettent de leur exprimer ici mes plus vifs remerciements.

Je remercie Messieurs les Professeurs J. CHEVAUGEON, L. HIRTH et J.H. WEIL, les Dr B. FRITIG, B. MONTIES et A. RAVISE de l'honneur qu'ils me font de juger ce travail et de l'intérêt qu'ils ont manifesté au cours de sa réalisation depuis de nombreuses années et à de maintes occasions: initiation et développement du programme, soutien budgétaire, stages en leur laboratoire, conseils judicieux ...

Mes remerciements vont également:

- à C. BOISSON qui durant de longues années a réalisé, à Adiopodoumé, des travaux sur le Pourridié blanc de l'Hévéa, ainsi qu'au regretté M. GOUJON qui a guidé mes premiers pas à l'ORSTOM.

- à Monsieur le Professeur Y. BOULANGER et au Dr F. FASIOLO qui ont effectué certaines analyses (composition en acides aminés et Finger prints) sur les peroxydases.

- à Messieurs les Directeurs de l'IRCA, de la SAPH (Société Africaine des Plantations d'Hévéa) et de la SOGB (Société des Hévéa de Grand Béréby) qui m'ont très largement ouvert l'accès aux plantations

- à mes collègues de l'"Equipe Fomes": B. HUGUENIN, M. NICOLE, D. NANDRIS, B. RIO; à KOUASSI KONAN, préparateur au Laboratoire, au dévouement et à la disponibilité exemplaires.

- à tous mes amis d'Adiopodoumé et à tous ceux qui, en Côte d'Ivoire ou en France, ont contribué à la réalisation technique du présent manuscrit.

SOMMAIRE

AVANT- PROPOS	1	1
INTRODUCTION		3
A- L'hévéaculture: situation générale et importance économique des deux agents pourridiés <i>R. lignosus</i> et <i>P. noxius</i>		3
1. Quelques données économiques		3
2. L'Hévéa - mode de plantation		4
3. Eléments de pathologie		5
B- Objectif des recherches: démarche adoptée		12
1. Objectif et cadre général de l'étude		12
2. Choix des enzymes à étudier		13
3. Progression adoptée: étapes et objectifs intermédiaires		14
MATERIEL ET METHODES		17
I - Matériel végétal		17
II - Les parasites		19
III - Mesure des activités enzymatiques; expression des et présentation des résultats		24
IV - Purification des enzymes, contrôle de pureté et détermination du pH isoélectrique		26
V - Dégradation du bois		28
VI- Autres techniques analytiques		38
RESULTATS		
CHAPITRE I: Modifications de quelques activités enzymatiques accompagnant l'attaque parasitaire signification de ces perturbations.		39
I - Perturbations accompagnant l'attaque parasitaire		39
II- Origine des enzymes des tissus parasités		43
1. Comparaison entre activités enzymatiques mesurées <i>in vivo</i> (pivot d'Hévéa) et <i>in vitro</i> (filtrat de culture)		43
2. Répartition spatiale des activités enzymatiques		45
3. Vérification en électrophorèse de l'origine de certaines enzymes des tissus parasités.		49
III- Discussion et conclusion		51

CHAPITRE II: L'AGRESSION PARASITAIRE; ROLE DES ENZYMES EXCRETEES PAR LES PARASITES	55
I - Modalités de l'excrétion des enzymes	55
1. Excrétion en fonction du temps de culture	55
2. Estimation du taux d'excrétion de quelques enzymes	59
3. Inductibilité des enzymes extracellulaires	61
II - La dégradation des polysides	67
1. Action des filtrats de culture de <i>R. lignosus</i> et <i>P. noxius</i> sur la sciure de bois d'Hévéa	67
2. Le complexe cellulolytique de <i>R. lignosus</i> et <i>P. noxius</i>	72
3. Le complexe pectinolytique	79
4. Les hémicellulases	86
5. Purification partielle et détermination de quelques caractéristiques physicochimiques des enzymes excrétées par <i>P. noxius</i>	86
6. Remarques sur l'équipement enzymatique des deux champignons	97
III - La dégradation de la lignine: rôle de la laccase	103
1. Purification des laccases de <i>R. lignosus</i> et de <i>P. noxius</i>	109
a) Identification des enzymes dans les filtrats de culture	109
b) Purification des laccases excrétées par <i>R. lignosus</i>	109
c) Purification de la laccase de <i>P. noxius</i>	110
d) Propriétés physicochimiques	113
e) Discussion	116
2. Effet de la laccase L1 de <i>R. lignosus</i> sur la lignine thioglycolique	119
a) Matériel et méthodes	119
b) Résultats	121
c) Discussion	131
IV - Dégradation d'autres macromolécules	133
1. Les estérases	133
2. Les protéases	133
3. Enzymes recherchées mais non identifiées dans les filtrats de culture et les extraits tissulaires.	135
V - Discussion	136
CHAPITRE III: REACTION DE L'HEVEA A L'AGRESSION PARASITAIRE: LA STIMULATION DE L'ACTIVITE PEROXYDASIQUE: SIGNIFICATION	139
I - Effet de l'infection sur l'activité peroxydasique des tissus	141
1. Variation de l'activité totale	141
2. Spécificité de la réaction au niveau des isoperoxydases	143

II - Purification et caractéristiques physicochimiques des enzymes P2a extraites, respectivement, de tissus parasités et de tissus de réaction	155
1. Purification des enzymes	155
2. Détermination des principales caractéristiques physicochimiques	159
III- Eléments de régulation	163
1. Mécanisme présidant à l'augmentation de l'activité de l'isoperoxydase P2a	163
2. Aspécificité au niveau de l'agent pathogène responsable de la réaction de l'Hévéa	164
IV- Discussion	166
CHAPITRE IV: MODALITES DE LA DEGRADATION DES TISSUS, <i>IN</i> <i>VITRO</i> ET <i>IN VIVO</i>, PAR <i>R. LIGNOSUS</i> ET <i>P. NOXIUS</i>	169
I - Dégradation, <i>in vitro</i> , de bûchettes de bois d'Hévéa; nature lignolytique de <i>P. noxius</i>	169
1. Effet comparé de <i>R. lignosus</i> , <i>P. noxius</i> et <i>Antrodia sp.</i> , sur la "perte en poids" des bûchettes et sur la dégradation de la lignine	169
2. Effet d'une source nutritive exogène sur l'aptitude de <i>R. lignosus</i> et <i>P. noxius</i> à dégrader le bois	173
3. Evolution de la composition monomérique de la lignine des bûchettes	173
II - Effet de l'infection de pivots d'Hévéa par <i>R. lignosus</i> et <i>P. noxius</i>	177
1. Variations du taux de lignine dans les différents types de tissus	177
2. Effect de l'infection sur la composition monomérique de la lignine résiduelle	181
III- Contrôle histologique et cytologique des modalités de l'infection par <i>R.</i> <i>lignosus</i> et <i>P. noxius</i>	181
1. <i>In vitro</i> (bûchettes infectées)	181
2. <i>In vivo</i> (tissu racinaire de plantules inoculées artificiellement)	183
IV- Discussion	185
CONCLUSION GENERALE	189
BIBLIOGRAPHIE	197

AVANT - PROPOS

Les travaux qui font l'objet du présent mémoire ont été réalisés dans le cadre de l'ORSTOM, Institut Français de Recherche Scientifique pour le Développement en Coopération, ayant vocation à effectuer des recherches en liaison étroite avec le développement des Pays d'accueil.

C'est dans ce contexte que le Laboratoire de Phytopathologie d'Adiopodoumé (Côte d'Ivoire) a développé notamment un programme sur les maladies racinaires de l'Hévéa. Généralement un matériel d'étude est choisi en fonction d'un objectif scientifique à atteindre. Dans le cas présent la démarche est inverse: c'est le matériel végétal qui est imposé pour des raisons économiques. En effet les couples Hévéa-agents de pourridiés ne sont choisis pour les possibilités d'étude qu'ils offrent dans le domaine des interactions hôte-parasite, mais au contraire ces études ont été entreprises avec pour objectif final la sauvegarde de l'Hévéa.

Dans cette optique deux axes de recherches ont, entre autres, été envisagés:

- recherche de marqueurs de l'infection (en relation avec le problème de la détection, si possible précoce, des arbres infectés en plantation)
- recherche de marqueurs de "résistance" (en relation avec le problème de la détection et , éventuellement de la sélection, d'arbres résistants ou tolérants à la maladie).

Cependant, au fur et à mesure de l'avancement des travaux, il est apparu que les couples Hévéa-*R. lignosus* et Hévéa-*P. noxius* pouvaient constituer des modèles applicables à d'autres couples hôte-parasite résultant de la confrontation d'une espèce ligneuse avec un agent pathogène colonisant le bois. Par ailleurs, au plan fondamental, l'étude des mécanismes biochimiques impliqués dans les relations hôte-parasite (ou présidant à leur établissement), chez de tels couples, était, et demeure encore, peu avancée. Enfin, toujours dans ce même domaine, la comparaison entre l'activité de deux agents pathogènes différents, *R. lignosus* et *P. noxius*, pouvait conduire à préciser le rôle de certaines activités enzymatiques dans le processus pathogénique.

C'est cet aspect particulier des recherches qui sera privilégié ici et qui servira de guide tout au long de notre exposé.

INTRODUCTION

Hevea brasiliensis est une Euphorbiacée qui, depuis le début du siècle, suscite un vif intérêt au plan économique en raison de sa haute productivité en latex, principale source du caoutchouc naturel. Par rapport aux autres plantes à latex, l'hévéa présente deux avantages considérables : d'une part le latex est récolté après une saignée de l'arbre (encoche au niveau du tronc) et non après broyage de la plante et extraction des molécules de polyisoprène et, d'autre part, la production peut être augmentée par stimulation à l'aide d'un composé chimique générateur d'éthylène. Dans les conditions actuelles de conduite des plantations les arbres sont exploités durant 20 à 25 ans.

A. L'HEVEACULTURE: SITUATION GENERALE ET IMPORTANCE DE DEUX AGENTS DE POURRIDIE: *RIGIDOPORUS LIGNOSUS* ET *PHELLINUS NOXIUS*.

1. QUELQUES DONNEES ECONOMIQUES.

Bien que l'Hévéa soit d'origine amazonienne, sa culture s'est très rapidement étendue à de nombreuses zones équatoriales et tropicales humides notamment aux pays asiatiques. En 1982 les superficies plantées de par le monde représentaient environ 7,5 millions d'hectares dont 92,4% en Asie (dont 78% pour la Malaisie, l'Indonésie et la Thaïlande), 6,9% en Afrique et seulement 0,7% en Amérique latine. Ces plantations produisent au total environ 3,75 millions de tonnes de caoutchouc dont 93,5% par l'Asie, 4,9% par l'Afrique et 1,5% par l'Amérique latine.

La contribution ivoirienne à cet ensemble demeure minime : 0,67% des surfaces plantées (43 000 ha en 1984 dont 26 600 t en saignée) et 0,9% de la production (35 000 t de caoutchouc-crêpe) pour un revenu global de 150 millions de Francs français environ (sources IRCA et APROMAC (*)).

Implantée en Côte d'Ivoire dans les années 50, l'hévéaculture s'est surtout développée depuis le début des années 70. Cette intensification s'est traduite par l'augmentation des surfaces plantées et l'amélioration de la productivité des plantations : sélection de clones haut-producteurs en latex, optimisation de l'exploitation des arbres, protection phytosanitaire des périmètres hévéicoles.

C'est dans ce dernier contexte que s'insèrent les recherches sur les interactions hôte-parasite entre l'Hévéa et deux de ses principaux parasites

(*) IRCA: Institut de Recherches sur le Caoutchouc en Afrique; APROMAC: Association des Producteurs et Manufacturiers de Caoutchouc

racinaires, *Rigidoporus lignosus* et *Phellinus noxius*, dont les principaux résultats seront présentés ci-après.

2. L'HEVEA - MODE DE PLANTATION.

L'Hévéa est un arbre de taille moyenne à fleurs monoïques. Son système racinaire, partie de l'arbre qui nous intéresse en priorité, comporte un pivot de 3 à 5 m de longueur et des racines plagiotropes disposées en couronne à quelques dizaines de centimètres sous le collet et communément désignées sous le terme de "plateau racinaire".

Actuellement la très grande majorité des plantations est constituée d'arbres greffés. La partie aérienne, issue du greffon, a une origine clonale déterminée. Les différents clones utilisés sont sélectionnés pour des caractères tels que productivité en latex, architecture de la couronne, densité foliaire, résistance à la casse au vent... Ces clones sont tous issus d'une vingtaine de plants seuls survivants des quelques 70.000 graines récoltées au Brésil il y a une centaine d'années. Les 7,5 millions d'hectares d'Hévéa plantés dans le monde proviennent de ces vingt plants après multiplication et croisements divers.

La partie souterraine, provenant du développement du porte-greffe, est issue de la germination d'une graine. Cette graine est elle-même issue, dans la très grande majorité des cas, de fécondation croisée. En pratique seul le géniteur femelle est connu. On dit des graines collectées sous les arbres d'un clone X qu'elles appartiennent à la famille illégitime X. Il en découle nécessairement qu'un lot de graines d'une famille illégitime donnée est hétérogène au plan du patrimoine génétique; il en va de même pour les porte-greffes (et donc pour le système racinaire des hévéas prélevés en plantation) qui en sont issus. En plantation l'hétérogénéité génétique des porte-greffes est encore amplifiée du fait que, les graines mises en germe regroupent des lots appartenant à plusieurs familles illégitimes. On dit de la population de plantules qui en résulte, qu'elle est issue de graines "tout venant". Ainsi, en plantation, la structure génétique d'une population de porte-greffes est hétérogène et exclue, par le fait même, toute notion de "lignée isogénique". La technique du bouturage permettrait théoriquement de réduire cette hétérogénéité; en pratique elle est cependant inapplicable, le système racinaire développé à partir d'un rameau ne comporte, en effet, pas de pivot, organe essentiel assurant un ancrage correct de l'arbre et donc une résistance efficace contre les tornades. Nous verrons plus loin l'incidence de cette situation sur l'interprétation des résultats des analyses biochimiques.

Une dernière remarque concernant les porte-greffes : le choix des familles illégitimes repose sur des caractères tels que compatibilité entre greffon et porte-greffes, qualité générale de l'enracinement...; la résistance aux parasites n'est pas prise en compte.

3. ELEMENTS DE PATHOLOGIE

a) Situation générale

L'Hévéa est sensible à de nombreux parasites, la plupart d'origine cryptogamique. Lors d'inspections phytosanitaires effectuées en 1949-50 et 1952 sur les plantations d'Hévéa du Cameroun et de l'ex-A.E.F., SACCAS (1953 a et b) recensait 75 champignons différents, dont 44 parasites susceptibles de présenter un danger réel ou potentiel pour cet arbre.

D'après les informations disponibles, parfois très anciennes, sur l'état sanitaire des plantations, dans les régions suivantes : Vietnam (BOUYCHOU, 1954), Ceylan (actuel Sri Lanka) (MURRAY, 1930), Malaisie (HILTON, 1959 ; SHARPLES, 1936), Indonésie et Malaisie (DIJKMAN, 1951), Afrique Equatoriale (SACCAS, 1953a et b ; PICHEL, 1956), il apparaît que la plupart des espèces nuisibles se rencontrent dans toutes les régions hévéicoles d'Asie ou d'Afrique. Il n'en demeure pas moins que leur incidence économique est très variable d'un continent à l'autre ou même parfois d'une région à l'autre distantes de quelques dizaines de kilomètres seulement.

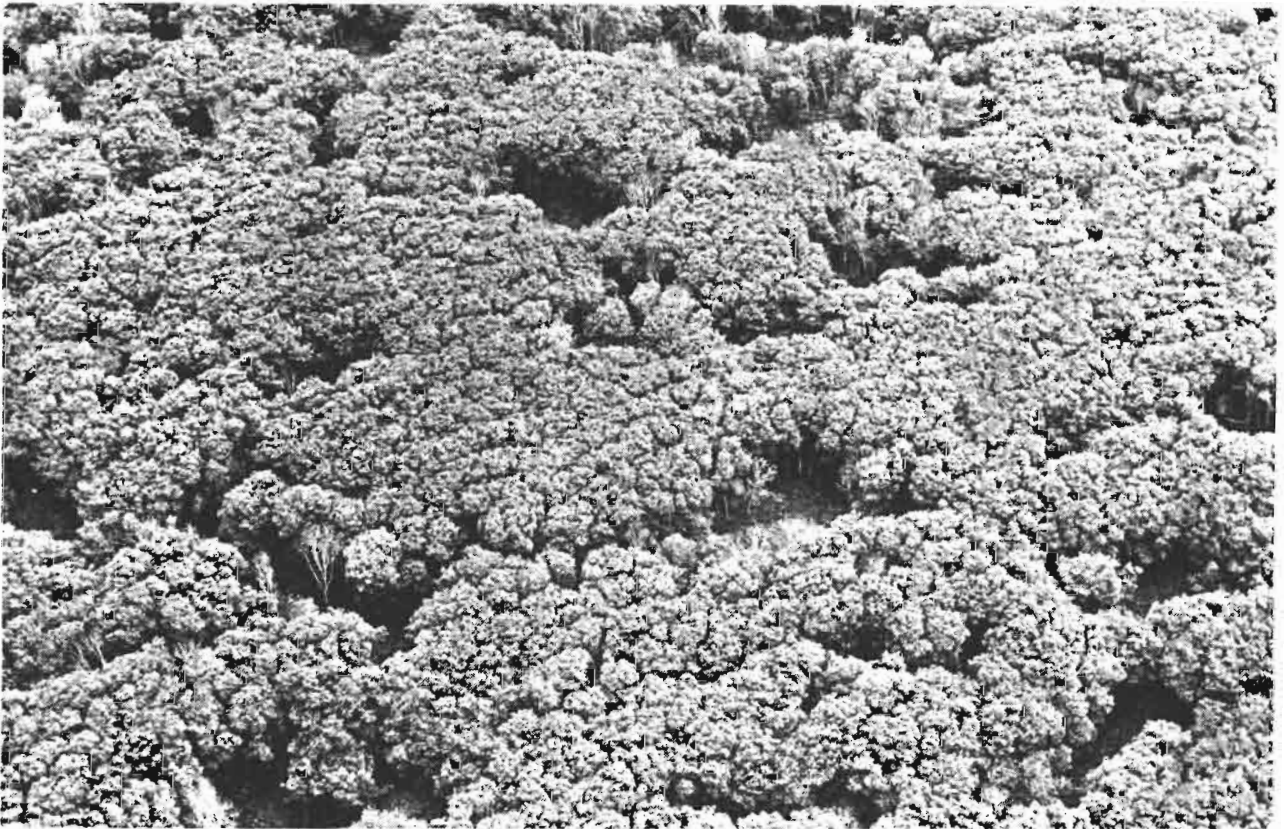
Ainsi, en Afrique, alors que *Armillariella mellea* sévit au Congo, ce parasite est quasiment inconnu en Côte d'Ivoire. De même *Phellinus noxius* ne se manifeste qu'occasionnellement dans les plantations de la région d'Abidjan, alors qu'il provoque des dégâts non négligeables sur les périmètres du Sud-Est et du Sud-Ouest du pays. En revanche *Rigidoporus lignosus* est présent, à des degrés divers, dans la plupart des zones hévéicoles du monde.

A l'opposé, *Microcyclus ulei*, responsable de la "Maladie Sud-Américaine des Feuilles" demeure, pour le moment, cantonné en Amérique latine. Ce parasite, véritable fléau de l'hévéaculture, provoque la défoliation totale et répétée des arbres entraînant rapidement leur mort. Il a interdit, jusque très récemment, tout développement conséquent des plantations au Brésil.

Parmi les autres parasites les plus communs sur Hévéa on peut citer *Colletotricum heveae* responsable d'une maladie foliaire (anthracnose) très sévère sur les plantations du Cameroun; *Helminthosporium heveae* également sur feuille, parfois *Phytophthora palmivora* sur fruit (DECLERT et NANDRIS, 1981) ; ce dernier est également responsable de graves altérations du panneau de saignée.

Cependant, de façon très générale, les dégâts les plus sérieux enregistrés sur les plantations africaines sont dûs à des maladies racinaires imputables à des agents de pourridiés (voir définition ci-dessous) tels que *Rigidoporus lignosus*, *Phellinus noxius*, *Ganoderma pseudoferreum*, *Ustulina zonata*, *Armillariella mellea*, *Sphaerostylbe repens*. En fait ces parasites existent en forêt naturelle où un équilibre semble s'être établi entre eux et les

Figure 1 - Vue aérienne d'une plantation d'Hévéa; l'attaque par les agents de pourridié provoque la mort des arbres et la formation de clairières au sein de la plantation.



multiples essences forestières, les unes sensibles, les autres tolérantes ou résistantes. Le plus souvent il existe dans une telle forêt de nombreux foyers ponctuels qui se développent de façon dramatique à la faveur de l'installation à grande échelle (généralement plusieurs milliers d'hectares d'un seul tenant), après abattage de la forêt, d'une culture monospécifique sensible que constitue une plantation d'Hévéa. Ainsi, comme le signalait déjà SHARPLES (1936), la connaissance de l'"antécédent parasitaire" (densité des foyers, nature des agents pathogènes) permet de préjuger, dans une certaine mesure, du devenir de la future plantation, au plan sanitaire. L'expérience prouve, en effet, que les précautions prises au moment du défrichage de la forêt (les souches et racines sont extirpées, rassemblées en endains puis brûlées) limitent simplement le "risque parasitaire" sans jamais l'éliminer totalement.

b) Les pourridiés de l'Hévéa en Côte d'Ivoire.

Bien que la plupart des agents de pourridiés cités plus haut puissent être recensés en Côte d'Ivoire, les dégâts les plus importants infligés aux plantations d'Hévéa sont imputables à *Rigidoporus lignosus* et à *Phellinus noxius*.

La répartition géographique de ces champignons est loin d'être uniforme et la distribution des foyers au sein d'une même plantation est le plus souvent hétérogène. Certains secteurs peuvent se révéler totalement indemnes, tandis que d'autres supportent des taux de pertes annuels atteignant, voire dépassant, 3%. Ces taux, parfois très élevés, sont dûs pour partie à l'existence d'une multiplicité de foyers primaires (en 1959, CHEVAUGEON recensait dans une forêt proche d'ABIDJAN 50 à 110 arbres ou arbustes, par hectare, envahis par *R. lignosus*) susceptibles de constituer autant de foyers primaires après abattage de la forêt et installation de la plantation d'Hévéa, et, pour partie, à l'extension ultérieure de la maladie à partir de ces derniers. Cette extension conduit à la formation de clairières grossièrement circulaires, s'agrandissant plus ou moins rapidement au fil des ans (Fig. 1).

Au cours du présent travail nous serons amenés à citer un troisième parasite, *Sphaerostylbe repens*, n'entraînant généralement pas la mort de l'arbre mais induisant très fréquemment la formation de tissus réactionnels.

1°. Eléments de nomenclature.

Le terme "pourridié" désigne un syndrome pathologique caractérisé par une attaque du système racinaire conduisant à une altération des tissus corticaux ou des tissus ligneux entraînant, la plupart du temps, le dépérissement puis la mort de l'arbre.

Fréquemment l'appellation "pourridié" est étendue, abusivement à l'agent responsable de la maladie. Ainsi *R. lignosus* est improprement appelé

"Pourridié blanc de l'Hévéa" alors qu'il conviendrait de dire "agent du pourridié blanc...".

Ces parasites provoquent une pourriture du bois qui peut être de deux types:

- pourriture blanche : elle résulte d'une décomposition de la lignine du bois; celui-ci adopte un aspect crémeux lorsque les tissus sont très dégradés. Les champignons lignivores, (qu'ils soient parasites ou saprophytes) décomposent également, au moins partiellement, la fraction polysaccharidique.

- pourriture brune : elle résulte de la dépolymérisation de la seule fraction polysaccharidique du bois. La lignine peut cependant être modifiée (déméthylation par exemple). Les résidus tissulaires prennent alors une teinte brune plus ou moins intense suivant le degré d'élimination des polysides pariétaux.

A noter qu'il n'existe aucune relation entre la "couleur" du pourridié et celle de la pourriture. Ainsi, comme nous le verrons plus loin, *Phellinus noxius*, agent du pourridié brun (aspect des symptômes externes) provoque une pourriture blanche (teinte des tissus dégradés).

2° *Rigidoporus lignosus* (Kl.) Imazeki.

* Position taxonomique

Ce Basidiomycète de la famille des Polyporacées est un parasite racinaire largement répandu dans les zones équatoriales et tropicales humides. Très polyphage, il s'attaque non seulement à des plantes cultivées (théier, cacaoyer, caféier, hévéa,...) mais également à de très nombreuses essences forestières (CHEVAUGEON, 1959).

Au plan taxonomique on relève que, par le passé, le champignon a été classé parmi les genres : *Polyporus*, *Rigidoporus*, *Leptoporus* et *Fomes*. Dans les années 20 la classification du champignon était à ce point incertaine qu'en 1923, PETCH écrivait "... In any case, the rubber root disease fungus of the East is not *P. (Polyporus) microporus*, and if Lloyd's identification of the latter with the real *F. (Fomes) lignosus* Klotzsh is correct, it cannot be *F. lignosus*. The conclusion would appear to be that none of the names which have been applied to the rubber root disease fungus is the right one, and that it is really an unnamed species". Quoi qu'il en soit l'agent responsable du pourridié blanc de l'Hévéa est encore fréquemment désigné sous le nom de *Leptoporus lignosus* (Kl.) Heim ex Pat ou *Fomes lignosus* (Kl.) Bres. Cette dernière dénomination demeure d'usage très courant dans le milieu hévéicole. Pour notre part nous le désignerons sous le nom de *Rigidoporus lignosus* (Kl.) Imazeki qui lui est actuellement attribué par les spécialistes du CMI (Commonwealth Mycological Institut).

* Développement du champignon *in vitro*

La morphogénèse du thalle du champignon s'effectue en plusieurs étapes caractérisées, chacune, par une forme mycélienne spécifique (BOISSON, 1968a, b et d, 1972). Le mycélium de type A qui se développe essentiellement au sein du milieu de culture, se révèle capable de croître en anoxie partielle. Dans certaines conditions ces hyphes peuvent se différencier en filaments de type B, à croissance rapide, qui ne se développent qu'à la surface du milieu de culture. Ces filaments peuvent se rassembler pour former des structures agrégées : palmettes, cordonnets et rhizomorphes.

Mycélium A et B se distinguent non seulement par leurs caractères culturaux et morphologiques mais également par ceux de leur métabolisme glucidique (BAREYRE et BOISSON, 1969) et par leur capacité à excréter des enzymes (GEIGER, 1975; 1977). Concernant ce dernier aspect, nous avons, en effet, pu montrer que seules les hyphes de type A sont capables d'excréter des enzymes susceptibles d'intervenir dans la dégradation des polymères pariétaux de la cellule végétale. *In fine*, les résultats de ces études morphogénétiques et biochimiques indiquent que la transformation, réversible, d'une forme mycélienne en une autre, est un événement fondamental non seulement au plan de la capacité de survie du champignon mais également à celui du processus pathogénique. Nous en avons déduit que la forme mycélienne B est spécialisée dans la dissémination du parasite (grâce surtout aux structures agrégées qui en dérivent) et que seules les hyphes de type A sont réellement infectieux (GEIGER, 1975).

Ces observations, alliées à celles effectuées sur les conditions d'infection "au champ", devaient conduire, ultérieurement, à la mise au point d'un système d'infection artificielle (NANDRIS et al., 1983) en plaçant le système "inoculum-racine de plantules d'Hévéa" dans des conditions asphyxiques (humidité volumique du sol portée artificiellement à 21% contre seulement 8 à 10% en conditions naturelles). Cette procédure favorise la transformation du mycélium B en hyphes A infectieux et conduit à un accroissement considérable du taux de réussite de l'infection.

* Développement *in vivo* : diagnose et principales étapes de la pathogénèse.

En plantation (ou en forêt naturelle) la présence de *R. lignosus* sur les racines est révélée par les rhizomorphes blanc-beige, légèrement orangés lorsqu'ils sont âgés.

L'apparition de symptômes foliaires ("racornissement" et jaunissement des feuilles) est tardive et annonce la mort prochaine de l'arbre. L'identification de l'agent pathogène est facilitée par la présence sur des arbres (gravement atteints, ou morts) de carpophores jaune-orangés caractéristiques, disposés en console à la base du tronc.

La contamination des arbres (et, par conséquent, l'extension des foyers), se fait soit par contact direct avec une racine infectée ou un débris ligneux colonisé, faisant office d'inoculum; soit par contact avec un rhizomorphe du champignon. De nombreuses observations effectuées en plantation révèlent que, dans la majorité des cas, la contamination des pivots a lieu à des niveaux situés très en profondeur dans le sol (--> 80 cm pour des terrains sableux, 10-20 cm en terrain argileux; suggérant l'influence favorable de conditions asphyxiques dans l'attaque parasitaire). Cette particularité rend très délicate la détection précoce et le traitement des arbres malades (DECLERT, 1960 ; MARTIN, 1964; MARTIN et Du PLESSIX, 1965 ; NANDRIS et al. 1984).

L'examen de coupes longitudinales de pivots partiellement colonisés par *R. lignosus* permet d'observer très nettement le front de progression du champignon dans le bois ; celui-ci est caractérisé par une teinte brune très prononcée. En avant de ce front, les tissus non envahis sont beige-clairs, en arrière, dans la zone la plus anciennement atteinte, le bois est blanchâtre.

Ainsi *R. lignosus*, **pourridié blanc de l'Hévéa** (couleur des rhizomorphes courant sur les racines contaminées) **provoque une pourriture blanche du bois, indice, théoriquement, de la nature lignivore du champignon.**

Enfin, dans quelques rares cas on observe la formation de tissus réactionnels tendant à circonscrire la zone des tissus infectés. Nous verrons plus loin l'intérêt et la signification d'une telle réaction.

3° *Phellinus noxius* (Corner) G.H. Cunn.

* Position taxonomique.

Basidiomycète de la famille des Polyporacées, ce parasite très polyphage, présent dans toutes les zones tropicales, a été décrit sous diverses dénominations : *Hymenochaeta noxia* Berk., *Pyropolyporus lamaensis* Mur., *Fomes lamaensis* (Murr.) Sacc. et Frott., *Fomes noxius* Corner, *Phellinus noxius* (Corner) G.H. Cunn.. Dans le passé une controverse animée s'était développée à propos de l'identité de l'agent du pourridié brun: *Fomes noxius* (synonyme : *Phellinus noxius* (PEGLER et WATERSTON, 1968) ou *Fomes lamaensis*. D'après MURRAY (1930) et ROGER (1951), c'est ce dernier qui serait responsable des dégâts sur Hévéa; SACCAS (1953b ; 1975)) et DIJKMAN (1951) notamment considèrent les deux dénominations comme synonymes, s'opposant en cela à l'opinion de taxinomistes tels que FIDALGO (1963).

En 1932, CORNER concluait qu'il existe bien deux champignons distincts (malgré une très grande ressemblance; responsable de la confusion) classés sous le même nom : d'une part le "vrai" *Fomes lamaensis*, saprophyte banal, et, d'autre part, le "vrai" parasite responsable du pourridié brun de l'Hévéa (et

d'autres plantes arbustives) qu'il appela *Fomes noxius*. Cette dénomination a été adoptée par la suite par de nombreux pathologistes (HILTON, 1959 ; PICHEL, 1956 ; *inter alii*). Enfin en 1975 THOROLD écrivait "Because of this confused nomenclature, and since *P. lamaensis* and *P. noxius* are separated microscopically, and as they are possibly not separable pathologically, it is convenient to consider them together here (*P. noxius sensu lato*)".

Pour notre part, *Fomes noxius* étant considéré comme synonyme de *Phellinus noxius* par les spécialistes du C.M.I. (PEGLER et WATERSTON, 1968), nous adopterons cette dernière dénomination pour l'agent du pourridié brun de l'Hévéa.

* Biologie du champignon.

Le développement *in vitro* de ce champignon a été peu étudié. Seule a été réalisée la détermination de l'optimum de croissance en fonction de la température et du pH du milieu. A noter que les cultures sur milieu gélosé ou sur buchettes de bois adoptent un aspect particulier caractérisé par la présence de plages ocres irrégulières, séparées par de fines lignes brun-foncé. La marge de la culture est constituée par un mycélium duveteux beige. Enfin nous n'avons jamais observé la production de rhizomorphes par *P. noxius*.

* Développement *in vivo*, diagnose.

L'attaque par *P. noxius* se distingue très facilement de celle de *R. lignosus* par la présence d'un manchon irrégulier formé de particules terreuses et de graviers agglutinés, maintenus en place par un réseau mycélien sécrétant des substances mucilagineuses. La teinte du manchon est généralement brun à ocre (d'où l'appellation "pourridié brun"), mais en fait dépend de la nature du sol. Les attaques anciennes se traduisent par la formation, à la surface du manchon, d'une pellicule fine et fragile de coloration noire. L'infection peut gagner non seulement l'ensemble du système racinaire mais également le collet de l'arbre. Sur *Delonix regia*, dans les Iles Mariannes, on a pu observer l'envahissement du tronc jusqu'à 2 m au-dessus du collet (HODGES et TENORIO, 1984). En raison de l'absence de rhizomorphes la contamination d'arbre à arbre se fait par contact direct entre une racine saine et une racine infectée ou un débris ligneux contaminé faisant office d'inoculum. C'est pourquoi l'extension des foyers à *P. noxius* est très généralement beaucoup plus lente que celle des clairières à *R. lignosus*. Par contre il semble que, au niveau individuel, l'attaque par le premier de ces parasites soit beaucoup plus foudroyante que celle dûe au second.

L'examen d'une coupe longitudinale d'un pivot parasité révèle qu'à un stade précoce de l'infection les tissus ont une teinte brun-orangée. Les tissus les plus dégradés sont cassants; ils sont parcourus par de fines lignes brun-foncé à noir délimitant des logettes. A ce stade qui n'est généralement atteint qu'après la

mort de l'arbre, la pourriture est dite alvéolaire. La teinte des tissus est beige un peu plus prononcée que celle du bois attaqué par *R. lignosus*.

L'ensemble de ces symptômes est systématiquement décrit par tous les pathologistes qui ont observé le pourridié brun sur diverses essences arbustives cultivées. Il est donc très vraisemblable que dans tous les cas il s'agisse du même parasite.

D'après ROGER (1951) et SACCAS (1975), le champignon responsable du pourridié brun de l'Hévéa (et d'autres plantes arbustives) occasionne une pourriture brune des tissus. Ce champignon est donc à classer parmi les agents non lignivores. Cependant nos observations sur la teinte adoptée par les tissus très atteints, ainsi que la description des dégradations tissulaires occasionnées par ce parasite sur *Delonix regia* ne nous permettent pas d'être aussi affirmatif.

B. OBJECTIF DES RECHERCHES ET DEMARCHE ADOPTEE.

I. OBJECTIF ET CADRE GENERAL DE L'ETUDE.

Comme nous venons de le voir, les observations effectuées *in vivo* révèlent que *R. lignosus* et *P. noxius* diffèrent par les symptômes, notamment intratissulaires, qu'ils provoquent sur un même hôte, l'Hévéa.

Nous avons mis cette situation à profit pour tenter de mettre en évidence des corrélations entre le comportement parasitaire des deux champignons et des différences d'ordre biochimique induites dans les tissus de l'hôte. Dans ce cadre, l'étude a été limitée aux enzymes intervenant dans les phénomènes d'agression parasitaire et de réaction de l'hôte (la nature des activités enzymatiques prises en considération sera précisée plus loin).

Ces recherches sur les interactions hôte-parasite ont été réalisées sur des pivots d'arbres adultes prélevés en plantation. Ce matériel permet d'étudier les événements tels qu'ils se déroulent effectivement dans la nature et donc d'éviter l'écueil d'un travail réalisé en milieu trop contrôlé conduisant à des résultats non directement transposables "sur le terrain". Par ailleurs ces pivots constituent une source d'échantillon disponible toute l'année.

Les expérimentations exécutées *in vitro* (caractérisation et détermination du rôle de différentes enzymes) ont été réalisées dans le but de préciser ou de conforter les résultats enregistrés *in vivo*.

Dans un cadre plus général ces recherches présentaient un intérêt supplémentaire du fait de la rareté des données disponibles sur les interactions hôte-parasite dans le cas d'hôtes fortement lignifiés et de parasites dégradant le bois (JOHANSSON et UNESTAM; 1982).

Notons enfin qu'au moment où nous abordons cette étude aucune donnée d'ordre biochimique n'était disponible sur les couples Hévéa-*R. lignosus* et

Hévéa- *P. noxius*. Seuls les résultats que nous avons précédemment acquis sur les enzymes excrétées, *in vitro*, par *R. lignosus* pouvaient offrir une base de travail.

En définitive nous avons estimé que les deux couples réunissaient des conditions devant permettre d'atteindre *in fine* l'objectif suivant : **vérifier si des différences d'équipement enzymatique existant au niveau des tissus attaqués par des parasites permettaient d'expliquer (ou de prévoir) des différences de comportement parasitaire.** Enfin, parallèlement à nos recherches, des études histo-cytologiques étaient réalisées (M. NICOLE, 1984) sur les mêmes couples hôte-parasites (plantules infectées artificiellement) permettant ainsi de comparer et confronter résultats biochimiques et observations en microscopie.

2. CHOIX DES ENZYMES A ETUDIER.

La réalisation de l'objectif que nous venons de définir repose pour une part sur l'étude des variations de l'équipement enzymatique (hôte et champignon). Dès lors était posé un problème fondamental: quelles enzymes et pourquoi?

D'emblée nous étions placés devant un choix à effectuer, pour deux raisons : d'une part les enzymes intervenant dans la pathogénèse ou les réactions de l'hôte ne sont pas toutes connues, d'autre part techniquement nous ne pouvions étendre nos investigations à plus d'une dizaine d'entre elles. Ceci étant précisé, il convenait de définir les bases du choix.

De manière très générale, il eût été satisfaisant de fonder cette étude sur une analyse d'enzyme-clefs, à condition d'être en mesure de définir clairement cette notion. Au plan théorique, si l'on considère l'intervention des enzymes dans la pathogénèse, les enzyme-clefs seront celles susceptibles de la conditionner (virulence ou résistance) ou de la moduler (agressivité ou tolérance). En pratique toute enzyme jouant le rôle de facteur limitant dans l'expression du pouvoir pathogène apparaît comme occupant une position clef, quel que soit son rôle réel au plan purement enzymatique. Ainsi, dans le cas des interactions hôte-parasites entre certaines races de *Colletotrichum lindemuthianum* et des variétés de haricot, c'est la capacité du champignon à excréter une α -galactosidase qui conditionne son pouvoir pathogène (ALBERSHEIM et al., 1969; ENGLISH et ALBERSHEIM, 1969), alors que, *a priori*, on aurait pu penser qu'un tel rôle serait plutôt dévolu à une polyosidase.

Cette observation montre que toute spéculation *a priori* quant à l'importance de telle ou telle enzyme dans la pathogénèse est vaine et que tout choix comporte une part d'aléa.

En pratique nous avons choisi de tester des enzymes témoignant de la capacité des champignons à dégrader les principaux polymères

pariétaux ; CM-cellulase, pectinase, β -glucosidase, α - et β -galactosidases. La laccase a été choisie comme témoin de l'aptitude à dégrader la lignine, ceci après analyse bibliographique et vérification de son rôle potentiel (voir chapitre III). Enfin, nous avons intégré à cette liste, la phosphatase acide enzyme universellement répandue, susceptible de constituer un marqueur des variations enzymatiques intratissulaires.

Toutes ces enzymes font partie de ce qu'il est possible de définir comme le pool des enzymes d'agression. En ce qui concerne l'aspect réaction, nous avons focalisé les recherches sur les peroxydases, certaines d'entre elles étant responsables de la polymérisation des unités de base de la lignine (GROSS, 1977) et, par conséquent, de la synthèse du polymère, que cette synthèse soit impliquée dans le processus normal de lignification d'un tissu ou dans celui d'une lignification réactionnelle fréquemment induite à la suite d'une agression d'origine parasitaire (voir chapitre III).

A l'occasion d'investigations plus ponctuelles, réalisées le plus souvent *in vitro*, d'autres activités enzymatiques ont été étudiées ou simplement recherchées : xylanase, laminarinase, protéase (enzymes reconnues comme participant à la pathogénèse (DOUX-GAYAT et al., 1978 ; PEGG et YOUNG, 1981 ; RABENANTOANDRO et al., 1976 ; ESQUERRE-TUGAYE, 1972), cellobiase, cellobiose hydrolase, activités enzymatiques appartenant au complexe cellulolytique excrété par des champignons (HIGHLEY, 1981).

Enfin, seules les enzymes "solubles" ont été prises en considération. Concernant les enzymes d'agression ce choix est justifié par le fait que les observations, au microscope, de coupes de tissus envahis par *R. lignosus* ou *P. noxius* ont révélé que la dégradation des parois intervenait à une certaine distance des filaments mycéliens, traduisant l'action de "facteurs" extracellulaires, diffusibles. Une telle action à distance prévaut pour d'autres champignons tels que *Sporotrichum pulverulentum* par exemple (RUEL et al., 1981); elle avait d'ailleurs déjà été présentée il y a cent ans par De BARY (1886; cité par BIRD, 1982)

Concernant la lignification il semblerait que puissent être impliquées des peroxydases liées au parois ou des peroxydases solubles (GRISEBACH, 1977). Cependant dans le cas d'une lignification réactionnelle, en réponse à une attaque parasitaire (OHGUCHI et al., 1974), ou même dans le cas de la lignification des tissus au niveau des greffes (QUESSADA et MACHEIX, 1984), les enzymes solubles semblent jouer un rôle fondamental.

3. PROGRESSION ADOPTÉE: ETAPES ET OBJECTIFS INTERMÉDIAIRES.

Les recherches ont été menées en plusieurs étapes au cours desquelles nous avons tenté de répondre aux questions suivantes :

a) L'attaque parasitaire induit-elle des perturbations au niveau de l'équipement enzymatique de l'hôte? Lesquelles? Existe-t-il des caractéristiques spécifiques permettant de différencier une attaque par *R. lignosus* d'une infection par *P. noxius*? Quelle est la signification de ces perturbations: réaction de l'hôte ou élément du système d'agression des parasites (origine des enzymes des tissus parasités: hôte ou champignons)? Sur la base des différences d'équipement enzymatique peut-on prévoir des différences de comportement parasitaire (aux niveaux tissulaires et moléculaires) entre *R. lignosus* et *P. noxius*?

b) Les enzymes étudiées sont-elles susceptibles de participer à la pathogénèse; en particulier interviennent-elles effectivement dans la dégradation des polymères pariétaux? Quelles sont les modalités d'excrétion?

Au cours de cette partie de l'étude, et après avoir défini quelques modalités de l'excrétion d'enzymes, plusieurs aspects seront abordés:

- la vérification de l'aptitude des filtrats de culture à dégrader le substrat naturel (sciure de bois d'Hévéa), prouve que le complexe multienzymatique des deux champignons est effectivement susceptible d'agir *in vivo*.

- l'identification précise de certaines activités enzymatiques (plus particulièrement celles participant à la cellulolyse et à la pectinolyse) dans le but de préciser et de comparer les potentialités réelles des deux organismes en matière de dégradation des polymères naturels. Une étude plus complète sera, de plus, réalisée sur les enzymes excrétées par *P. noxius*.

- le rôle effectif de la (ou des) laccase(s) dans la "transformation" de la lignine. Au cours de cette étude nous avons considéré que la laccase était capable de dépolymériser la lignine (ou au moins de participer à la dégradation de ce polymère). En pratique il existe une controverse à ce sujet entre différentes "écoles". Divers rôles sont avancés: polymérisation ou dépolymérisation de la lignine, détoxification des milieux, régulation de la biosynthèse d'autres enzymes, etc... Il était donc essentiel, dans l'optique de notre étude, de démontrer que la laccase est réellement capable de dégrader le polymère (même si elle ne joue pas exclusivement ce rôle).

Les résultats intermédiaires sont comparés à ceux enregistrés pour d'autres organismes. En effet, contrairement à la situation qui prévaut *in vivo*, les informations disponibles *in vitro*, sur les conditions physiologiques et biochimiques de la biodégradation du bois sont extrêmement riches. Ceci provient du fait que, outre l'intérêt présenté par ces recherches au plan fondamental, l'activité déployée dans ce domaine est stimulée par les applications potentielles à court terme et les retombées économiques qu'elles sont susceptibles d'entraîner dans des domaines tels que: dépollution, économies d'énergie, valorisation des résidus (des industries du bois en général,

de l'industrie papetière en particulier, résidus agricoles, paille des céréales notamment)...

- c) Quelles sont les modalités de la réaction de l'Hévée en ce qui concerne l'activité peroxydasique ? Quelle est la signification potentielle de cette réaction ?

Seront abordés, dans ce chapitre, les problèmes liés à la variabilité de la réponse de l'hôte au plan de l'activité peroxydasique globale et la détermination d'une caractéristique commune à chacune de ces réponses: la stimulation d'une isoenzyme spécifique. Une étude approfondie de l'isoenzyme extraite des tissus parasités et des tissus réactionnels sera réalisée afin de confirmer l'origine (l'Hévée) de cette isoenzyme. Seront également étudiés des aspects liés à la biosynthèse de l'enzyme et à sa participation potentielle à la biosynthèse de la lignine.

d) Quelles sont les dégradations effectuées par les parasites *in vitro* (bûchettes de bois stérilisées) et *in vivo* (dans les tissus de l'hôte)? Existe-t-il une différence entre les modalités de l'agression par *R. lignosus* et *P. noxius* ? Existe-t-il effectivement une lignification de réaction ? Enfin, existe-t-il une concordance entre les résultats de l'analyse chimique et ceux de l'étude histo-cytologique ?

L'objectif de cette partie est double:

- vérifier, par voie chimique et par l'observation cytologique, la nature des dégradations infligées par *R. lignosus* et *P. noxius* aux tissus du bois.
- Effectuer une synthèse des données acquises et vérifier s'il existe effectivement une corrélation entre les différents résultats (équipement enzymatique \leftrightarrow nature des altérations tissulaires et cellulaires).

e) Conclusion générale:

Les différences d'équipement enzymatique existant entre *R. lignosus* et *P. noxius* (tissus parasités et filtrats de culture) permettent-elles d'expliquer la spécificité du processus pathogénique qu'ils développent respectivement ?

Ces quatre groupes de questions déterminent la structuration du présent travail en quatre chapitres:

- Modifications de l'équipement enzymatique des tissus racinaires induites par l'infection ; signification de ces perturbations.
- L'agression parasitaire ; rôle des enzymes excrétées par les parasites.
- Réactions de l'Hévée à l'agression parasitaire ; signification.
- Modalités spécifiques de la dégradation des tissus, *in vitro* et *in vivo*. Corrélation: équipement enzymatique du parasite - comportement parasitaire.

MATERIEL ET METHODES

I. MATERIEL VEGETAL

1. Origine et prélèvement des tissus; extraction des enzymes.

Toutes les analyses ont été réalisées sur des pivots adultes (4 à 8 ans) prélevés en plantation et donc infectés naturellement. De ce fait et pour les raisons indiquées plus haut, l'origine génétique ne peut, sauf exception, être précisée.

Dans tous les cas, seuls les tissus lignifiés du xylème sont étudiés. Ils sont prélevés à l'aide d'un ciseau à bois sur des pivots adultes préalablement sectionnés en deux parties égales dans le sens de la longueur.

Les copeaux de bois sont réduits en sciure par un broyage très rapide et à sec (broyeur à couteaux Gondard, tamis à trous de 2mm de diamètre). Malgré la brièveté du temps de broyage et le fait qu'aucune élévation de température notable n'ait été observée au niveau de la sciure recueillie, il est possible que le choc des couteaux sur les tissus puisse provoquer un accroissement de température localisé et éventuellement entraîner une inactivation locale des protéines enzymatiques. Il en résulterait globalement une sous-estimation des activités enzymatiques des tissus. Nous pensons néanmoins que cette situation, au cas où elle se produirait, n'affecterait pas la validité des conclusions que nous tirons des résultats dans la mesure où elles reposent sur une étude comparative des activités enzymatiques extraites de tissus broyés dans des conditions identiques. Cette sciure est ensuite mise à macérer durant une nuit et à 4°C dans un tampon phosphate de sodium (0,0125 M à pH 6) à raison de 5 ml par gramme de tissu (poids frais). Après macération, les extraits sont récupérés par filtration sur verre fritté de porosité 1, puis centrifugés durant 15 minutes à 20 000 g.

2. Echantillonnage

Des essais préliminaires ont révélé une variabilité importante des activités enzymatiques d'un arbre à l'autre, même pour des individus voisins, d'âge identique et ayant eu une croissance dans des conditions climatiques et pédologiques similaires. Cette variabilité est vraisemblablement due au fait que les pivots proviennent de graines issues de fécondations "illégitimes" et possèdent donc des patrimoines génétiques différents.

Se posait donc de façon cruciale le problème du "témoin sain". Nous avons pallié à cette situation en n'analysant que des pivots partiellement envahis par

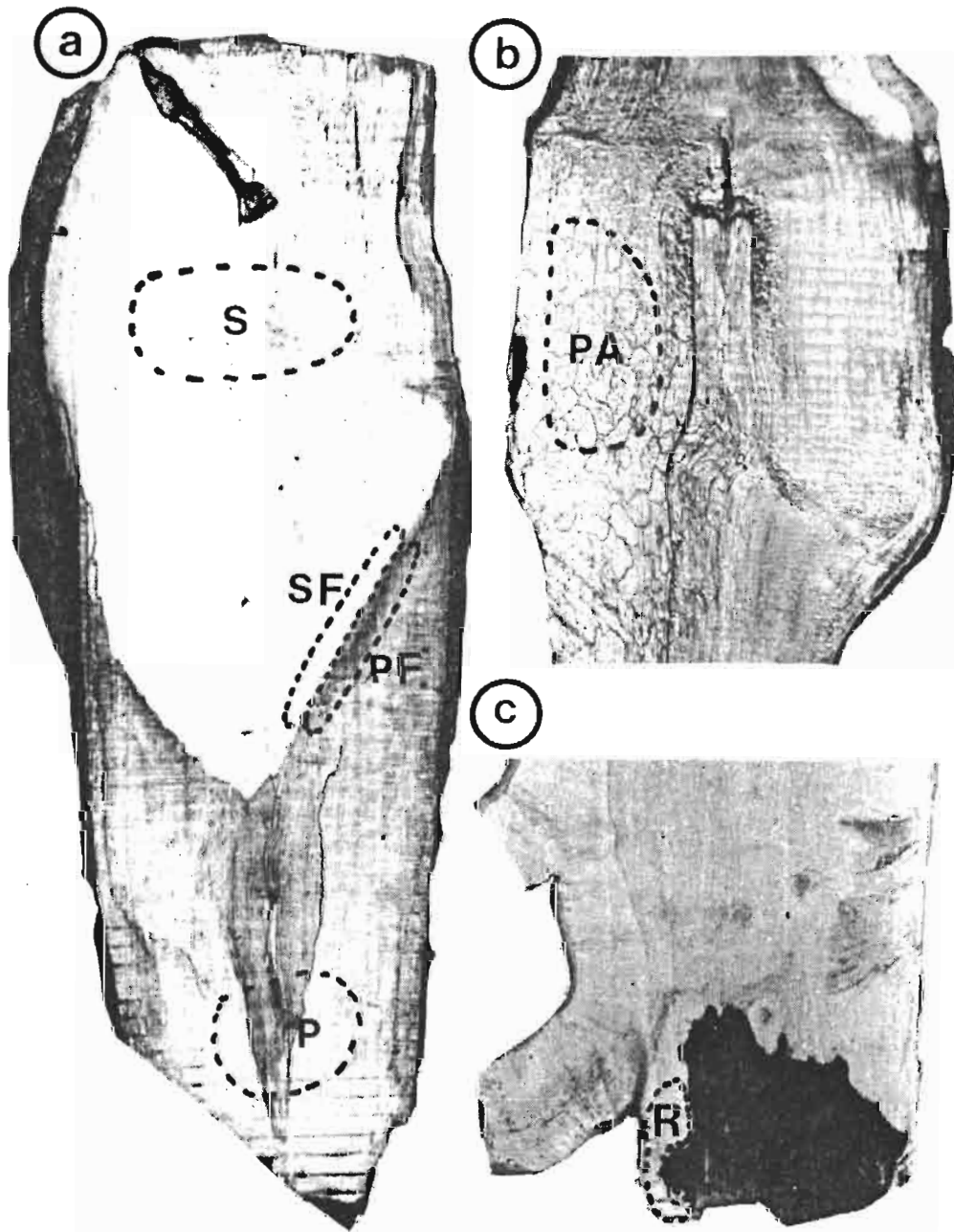


Figure 2 - Pivots d'Hvéva tronçonnés dans le sens de la longueur: aspect et lieu de prélèvement des différents types de tissus: **a)** S: tissus sains - SF: tissus proches du front de progression du parasite - PF: tissus parasités du front - P: tissus parasités éloignés du front. **b)** tissus parasités de type alvéolaire (uniquement en cas d'attaque par *P. noxius*). **c)** tissus réactionnels.

les champignons et comportant une zone de tissus sains et une zone de tissus parasités. En effet une étude préliminaire (GEIGER et al., 1976) sur la répartition de des activités laccase et peroxydase au sein de pivots avait montré que les tissus de la partie saine des pivots ne subissent pas de perturbation notable au niveau de leur équipement enzymatique. Pour chaque pivot ce tissu peut donc être légitimement considéré comme un témoin par rapport auquel seront caractérisées les perturbations qualitatives et quantitatives existant dans les tissus parasités.

La répartition spatiale des enzymes au sein des pivots n'a également été étudiée que sur des pivots d'arbres adultes. Dans ce cas, et pour chaque pivot, les échantillons suivants ont été analysés (Fig. 2a, b et c).

- * Tissus sains (S) : prélevés très en avant du front de progression du parasite, (Témoin).
- * Tissus sains du front (SF) : prélevés au voisinage du front de progression .
- * Tissus parasités du front (PF).
- * Tissus parasités (P) : : prélevés très en arrière du front (tissus "très anciennement" colonisés).
- * Tissus parasités de type alvéolaire (PA) : prélevés dans des zones où les tissus sont très dégradés et présentent cet aspect caractéristique (Fig. 2b; en cas d'infection par *P. noxius* uniquement).

Pour certaines études, nous avons également analysé des tissus réactionnels (R) (Fig. 2c) que l'on observe, occasionnellement, sur des pivots attaqués par *R. lignosus* et, très fréquemment, à la suite d'une attaque corticale par *Sphaerostylbe repens*.

II. LES PARASITES.

1. Origine

Les souches de *Rigidoporus lignosus* et de *Phellinus noxius* régulièrement utilisées au cours de ce travail ont été isolées sur des pivots provenant respectivement de la plantation de l'IRCA (région d'Abidjan) et de la plantation de la SOGB (Société des Caoutchoucs de Grand-Béréby; Sud-Ouest de la Côte d'Ivoire). Elles sont répertoriées en mycothèque sous la dénomination **RL st**; **PN st**. Au cours de certains essais nous avons mis en oeuvre une seconde souche de *R. lignosus*(**RL 68**) en provenance du Gabon.

Enfin lors des comparaisons du pouvoir de dégradation du bois par les deux agents pathogènes nous avons introduit à titre de témoin un agent de pourriture brune du bois de sciage, *Antrodia sp*, qui nous a été fourni par le CTFT (Centre Technique Forestier Tropical; Nogent/Marne).

2. Conditions de culture

a) Entretien des souches en mycothèque

Les souches des champignons sont conservées sur milieu malté (2%) et gélosé (2%) en tube à essais (d=18cm). Elles sont repiquées sur milieu neuf tous les trois mois.

b) Cultures sur sciure d'Hévéa

Dans le but de comparer leurs capacités respectives en matière de production d'enzymes extracellulaires, les deux champignons sont cultivés sur sciure de bois d'Hévéa (10 g pour 100 ml d'eau, en Erlenmeyer de 250 ml ; stérilisation 45 minutes à 120°C).

Ce milieu a été choisi parce que le plus proche possible du substrat que les champignons utilisent durant leur développement parasitaire.

c) Culture sur "bouillon de sciure d'Hévéa"

Ce milieu dérive du précédent. Après autoclavage de la sciure (100 g pour 1 l d'eau), le milieu est filtré sur verre fritté. Le filtrat est réajusté au volume initial; le "bouillon" qui en résulte est utilisé comme milieu de culture (100ml/Erlenmeyer de 250ml) après une nouvelle stérilisation de 45 mn à 120°.

Ce milieu est mis en oeuvre soit pour la production d'enzymes soit lorsque l'expérimentation nécessite la récupération du mycélium (comparaison entre activités intra- et extracellulaires).

Enfin le bouillon de sciure d'Hévéa peut être gélosé et réparti en boîtes de Pétri dans le but soit de constituer des précultures soit d'estimer la croissance mycélienne sur un substrat naturel.

d) Cultures sur "bûchettes d'Hévéa"

Elles sont effectuées sur des bûchettes (L : 5 cm, l : 1,5 cm, épaisseur : 3 mm) taillées dans le pivot sain d'un Hévéa adulte. Ces bûchettes sont introduites dans des tubes de Roux de 2 cm de diamètre à raison de trois bûchettes par tube. L'humidité est assurée par addition d'un volume d'eau suffisant pour remplir le réservoir inférieur du tube et atteindre un niveau correspondant à environ 1/4 de la hauteur des bûchettes. L'ensemble est stérilisé par autoclavage durant 45 minutes à 120°C. Après refroidissement, les bûchettes sontensemencées à l'aide d'un implant mycélien prélevé sur une préculture en milieu malté et gélosé.

Ce milieu, aussi proche que possible du substrat naturel, a été mis en oeuvre d'une part pour estimer le pouvoir dégradatif des champignons, d'autre part pour estimer l'évolution de la production en enzymes durant une longue période de culture.

L'influence d'un milieu nutritif sur la capacité des champignons à

Tableau 1

Croissance radiale journalière (en mm) des souches de *R. lignosus* (Lst et L68) et de *P. noxius* (Nst).

Souches et milieux de culture	J2	J3	J4	J5
Lst/ glucose*	5,9	9,3	11,1	14,1
Lst/ hévéa*	9,6	10,3	11,4	14,8
L68/ glucose*	7,7	8,5	9,2	10,6
L68/ hévéa*	8,0	10,4	11,4	11,2
Nst/ glucose*	10,6	14,2	9,6	-
Nst/ hévéa*	13,5	15,2	12,8	-

* glucose: milieu minimum glucosé et gélosé; hévéa: milieu bouillon de sciure d'hévéa gélosé.

dégrader le bois est vérifiée dans des conditions différentes : les buchettes de bois, de même taille que les précédentes, sont placées dans des Erlenmeyer contenant soit des billes de verre (diamètre 1 cm) + 30 ml d'eau (les buchettes sont déposées sur les billes de manière à éviter qu'elles ne flottent sur l'eau), soit 50 ml de milieu malté (2%) et gélosé (2%). Dans ce dernier cas les buchettes sont autoclavées séparément et déposées sur le milieu après solidification de celui-ci.

3. Estimation de la croissance mycélienne.

La plupart des milieux de culture utilisés ne permettent pas de comparer la croissance des deux champignons et donc de rapporter une activité enzymatique à une telle croissance. Il était donc important de vérifier si les deux agents pathogènes présentaient des aptitudes comparables dans ce domaine. Cette comparaison a été réalisée en cultivant *R. lignosus* et *P. noxius* sur les deux milieux suivants :

- milieu bouillon de sciure d'Hévée gélosé
- milieu minimum gélosé et glucosé (composition: par litre de milieu : NaNO_3 : 2 g ; KH_2PO_4 : 0,8 g ; K_2PO_4 : 0,2 g ; Mg SO_4 : 0,5 g ; KCl : 0,5 g ; FeSO_4 : 1mg ; thiamine : 0,5 mg ; asparagine 1 g ; glucose : 20 g).

Les résultats révèlent qu'après un "démarrage" plus rapide de la part de *P. noxius* durant les trois premiers jours de culture, les vitesses de croissance journalières évoluent de manière comparable chez les deux souches étudiées (RL st et PN st)

4. Préparation des filtrats de culture et des extraits mycéliens.

Les filtrats de culture sont prélevés par filtration sur verre fritté de porosité N° 1, puis centrifugés durant 15 minutes à 20 000 g.

Les extraits mycéliens sont réalisés par broyage des thalles (préalablement rincés à l'eau distillée et essorés entre des feuilles de papier filtre) dans une solution tamponnée de phosphate mono- et dipotassique 0,0125M à pH 6. Le broyat est centrifugé durant 15 minutes à 20.000 g. Le surnageant constitue l'extrait à analyser.

Lors des essais ayant pour but d'apprécier le taux d'excrétion enzymatique et le taux d'enzymes liées ioniquement aux parois, la procédure suivante est adoptée:

- Filtration du milieu de culture --> lavage du mycélium par du tampon phosphate 0,125 M pH 6---> lavage du mycélium par le même tampon additionné de NaCl (0,75 M final) broyage du mycélium (tampon phosphate de sodium 0,0125 M pH 6) et enfin lavage du résidu de broyage par la solution NaCl 0,75 M.

Toutes ces solutions sont filtrées, centrifugées et testées pour les différentes activités enzymatiques. Pour chacune d'entre elles la proportion de l'activité contenue dans chaque fraction est exprimée en pour cent de l'activité totale (somme des activités de toutes les fractions).

III. MESURE DES ACTIVITES ENZYMATIQUES; EXPRESSION ET PRESENTATION DES RESULTATS.

1. Tests enzymatiques et expression des résultats.

Les activités enzymatiques suivantes : phosphatase acide (Pase) (E.C.3.1.3.2), b-glucosidase (b-glu) (E.C. 3.2.1.20), a- et b-galactosidase (a- et b-gal) (E.C. 3.2.1.22 et E.C. 3.2.1.23) sont testées, à 30°C, dans un milieu réactionnel (volume final : 1 ml) tamponné à pH 4,5 (tampon acétate de sodium 0,05 M) contenant les substrats (p-nitrophényl phosphate et p-nitrophényl glycosides correspondants) à une concentration finale égale à 0,02 M. La réaction est arrêtée par addition de 4 ml de solution tamponnée Tris-glycine à pH 11 permettant de révéler le p-nitrophénol libéré au cours de la réaction enzymatique. Les activités sont exprimées en nano-moles de substrat transformé par minutes et par gramme de tissus frais (ou par ml de filtrat de culture).

CM-cellulase (E.C. 3.2.1.4) et pectinase (E.C. 3.2.1.15) sont testées à pH 4,6 (Tampon citrate de sodium 0,025 M) selon la méthode viscosimétrique d'une part et la technique basée sur la mesure du pouvoir réducteur du milieu réactionnel d'autre part.

La première est réalisée à l'aide d'un viscosimètre d'Ostwald plongé dans un bain-marie thermostaté à 30°C, contenant le milieu réactionnel (volume final: 8 ml) suivant: CM-cellulose à 0,4% ou polypectate de sodium à 1%, filtrat de culture ou extrait enzymatique: volume variable. Les résultats sont exprimés en AR(activité relative) par gramme de tissus frais (ou par ml de filtrat de culture); $AR = 1/t_{50}$; (t_{50} = temps, en minute, nécessaire pour observer une réduction de 50% de la viscosité du milieu réactionnel).

Le dosage des sucres réducteurs libérés au cours de l'hydrolyse du polymère est effectué dans un milieu réactionnel (volume final : 2 ml) contenant les substrats à une concentration égale à 0,05% pour la CM-cellulose et 0,1% pour le polypectate de sodium. La réaction est arrêtée par addition de 2 ml de réactif à l'acide dinitro-salicylique (DNS). Ce mélange est porté à 100° durant 5 minutes, puis refroidi dans un bain glacé. La Densité Optique (DO) est mesurée par spectrophotométrie à 540 nm. L'activité enzymatique est exprimée en μ moles du sucre monomère libéré par gramme de tissus frais (ou par ml de filtrat de culture) par heure.

Xylanase (E.C.) et laminarinase (E.C.....) sont testées par la méthode au DNS (sucres réducteurs) dans les conditions identiques à celles

décrites ci-dessus (concentration en substrat: 0,2%).

Cellobiase (E.C. 3.2.1.21) et exoglucanase (E.C. 3.2.1.74 : 1,4-b-D-glucane glucohydrolase; ou E.C. 3.2.1.91: 1,4-b-D-glucane cellobiohydrolase) sont testées dans un milieu réactionnel tamponné à pH 4,6 (tampon citrate de sodium 0,025M) contenant respectivement du cellobiose à 0,02M ou de l'Avicel (cellulose microcristalline insoluble) à 1%. Les sucres réducteurs libérés à partir de l'Avicel sont dosés par la méthode au DNS. Lorsque la composition du milieu réactionnel est analysée par chromatographie en couche mince (CCM) de silice, la concentration du tampon est ramenée à 0,001 M; (des concentrations plus élevées en tampon citrate provoquant des "trainées" sur la plaque).

Les activités cellobiose oxydase et cellobiose quinone oxydoréductase sont mesurées, respectivement selon la technique de AYERS et AYERS (1978) et de WESTERMAK et ERIKSSON (1974 a et b) utilisant du cellobiose pour la première et du cellobiose et de la 3,5-ditertiobutyl-o-benzoquinone pour la seconde.

L'activité peroxydasique (E.C. 1.11.1.7) est testée à température ambiante en milieu tamponné (phosphate de sodium : 0,05 M à pH 6; volume final : 5 ml) contenant du gaïacol à 0,2% et de l'eau oxygénée à 0,1%. Le temps d'incubation est généralement égal à 1 minute. Pour la mesure des activités spécifiques la réaction est toujours effectuée sur un milieu préparé extemporanément et le déroulement de la réaction (DO_{420nm}) est enregistré; l'activité est calculée à partir de la portion linéaire du graphe. Lorsque l'on recherche l'effet des ions calcium sur l'activité peroxydasique, l'incubation est réalisée dans un tampon Tris-maléate 0,05 M à pH 6,8.

L'activité laccase (E.C. 1.10.3.2) est mesurée dans les mêmes conditions que celle de la peroxydase (en l'absence d'eau oxygénée). Celle de *R. lignosus* est testée en milieu tamponné à pH 6, tandis que celle de *P. noxius* est mesurée en milieu acétate 0,05 M à pH 4,5.

Les activités laccase et peroxydase sont exprimées en $DO_{420} \times 1000$ par gramme de tissus frais (ou par ml de milieu réactionnel ou par DO_{402}) par minute.

Dans tous les cas les témoins sont obtenus par des "réactions" arrêtées au temps : $t = 0$, ou à partir de milieux contenant des enzymes thermo-inactivées (10 minutes à 100°).

2. Présentation des résultats.

Dans certains cas et pour faciliter les études comparatives nous avons adopté une présentation sous forme d'histogrammes. Ceux-ci sont construits selon les principes suivants :

Pour chaque activité enzymatique, la hauteur des "colonnes" correspondant aux différents types de tissus, est proportionnelle à l'activité enregistrée dans l'extrait du tissu en question ; cette hauteur est calculée par

référence à l'activité maximale enregistrée (quelle que soit la nature du tissu) à laquelle on affecte l'indice 100. Cette présentation permet de comparer les tissus les uns aux autres, ceci pour chaque type d'activité enzymatique. En outre, pour chaque type d'enzyme, nous indiquons la valeur effective de l'activité (exprimée dans les unités définies plus haut) correspondant à l'indice 100.

Cette technique de présentation est adoptée pour les figures 4a, b et 6a, b (Chapitre I).

Enfin, un mode de présentation similaire est utilisé pour comparer entre elles (et par type de tissus et de filtrat de culture) les quatre activités enzymatiques : phosphatase acide, b-glucosidase, a- et b-galactosidase dont les activités sont exprimées dans la même unité (Fig. 5 ; Chapitre I).

IV. PURIFICATION DES ENZYMES, CONTROLE DE PURETE ET DETERMINATION DU pH ISOLECTRIQUE.

Nous n'en présentons ici que les aspects généraux ; au cours de certaines purifications des variantes spécifiques ont pu être introduites ; elles seront alors mentionnées dans le texte ou la légende des figures.

1. Purification

a) "Batch" DEAE-Cellulose

La première étape de purification consiste généralement en une adsorption des protéines sur de la DEAE-Cellulose (Watman DE52). Dans ce but une faible quantité de cet échangeur d'ions est ajoutée directement au filtrat de culture. Après 30 minutes de contact sous agitation douce, la DE 52 est récupérée par filtration sur verre fritté. Ces opérations sont renouvelées jusqu'à adsorption de toutes les activités enzymatiques.

Les lots de DE52 sont alors rassemblés et lavés par une solution tamponnée (phosphate de sodium 0,0125 M à pH 6). Les enzymes sont ensuite éluées par une solution tamponnée de force ionique élevée (phosphate de sodium 0,0125 M à pH 6, NaCl 0,5 M). L'éluat est renouvelé à 3 reprises afin de récupérer le maximum des activités enzymatiques initiales. Cette étape présente un double intérêt : concentration des enzymes et élimination d'une grande partie de la pigmentation brune originelle.

Après centrifugation de l'éluat total, celui-ci est concentré par filtration sur un ultrafiltre AMICON PM 10 (seules les molécules d'un Poids Moléculaire (PM) <10 000 D traversent cette membrane), puis lavé à deux reprises, avec concentration intermédiaire, par une solution tamponnée (phosphate de sodium 0,0125 M pH 6 ou Tris-HCl 0,0125 M à pH 8,4). Cette opération remplace la dialyse concentrante classique, elle permet à la fois d'éliminer une partie supplémentaire des pigments, de concentrer la solution

enzymatique et d'amener celle-ci à des conditions de pH et de force ionique compatibles avec la suite des opérations.

b) Chromatographie sur colonne de DEAE-cellulose

La solution enzymatique est déposée au sommet d'une colonne de DEAE-Cellulose (d : 2 cm, h : 18 cm) équilibrée dans le tampon phosphate de sodium 0,0125M à pH 6 ou Tris-HCl 0,0125 M à pH 8,4. L'élution est réalisée par un gradient linéaire en force ionique croissante (volume des fractions = 4,5 ml; débit: 50ml/h).

c) Chromatographie sur hydroxyapatite

Cette étape de purification est réalisée sur une colonne (d : 1,5 cm, h : 8 cm) contenant un mélange (3 : 1 ; P/P) d'hydroxyapatite et de Cellulose (Watman F1), équilibrée avec un tampon phosphate de sodium 0,01 M à pH 6. Les protéines sont éluées par étapes successives à l'aide des solutions tamponnées : phosphate de sodium pH 6 : 0,01 M puis 0,03 M et enfin 0,05 M. (La chromatographie sur colonne d'hydroxyapatite n'est utilisée que pour la purification des deux laccases de *R. lignosus*).

d) Filtration sur gel de Sephadex - estimation du PM des enzymes

Elle est réalisée en colonnes de gel de Sephadex G50, G75, G100, G150 ou G200 (d : 1,8 cm, h : 100 cm), préalablement équilibrées avec un tampon phosphate de sodium 0.05 M à pH 6 (volume des fractions: 1,1ml; débit: 8 à 20 ml/h suivant la nature du gel). Cette étape permet, soit de purifier les enzymes; soit d'en déterminer le poids moléculaire (ANDREWS, 1964). Dans ce dernier cas la colonne est étalonnée au moyen de molécules de PM connu : sérum albumine bovine (BSA) : 68 000 D ; ovalbumine (OVB) : 43 000 D ; anhydrase carbonique (ANH) : 31 000 D ; cytochrome c (Cyt c) : 12 500 D ; vitamine B12 (B 12) : 1 735 D ; o-diphénol (ONP) : 139 D.

2. Contrôle de pureté des enzymes - Estimation des PM (gel de polyacrylamide)

Ce contrôle est effectué par électrophorèse en gel d'amidon (SMITHIES, 1955 ; SHAW and PRASAD, 1970) ou en gel de polyacrylamide (7,5 % ; Tris-HCl 0,2 M à pH 8,5) en conditions dénaturantes (WEBER et OSBORNE, 1969) ou non dénaturantes (DAVIS, 1964). L'activité laccase est révélée en plongeant le gel dans le milieu réactionnel (gaïacol à 0,2 % , 3- Amino-9-éthyl carbazolé à 0,03 % , CaCl₂ : 0,001M, dans un tampon acétate de sodium 0,05 M à pH 5). L'activité peroxydasique est révélée de la même manière en présence d'eau oxygénée (0,1%).

L'activité des glycosidases est révélée selon la technique de COLAS et ATTIAS (1975) à l'aide des dérivés 6-bromo-2-naphtyl-a (ou b) D-galactoside (ou a- (ou b)-D-glucoside). L'activité phosphatase acide et leucylaminopeptidase sont révélées selon les techniques de SHAW et PRASAD (1970). Les zymogrammes sont fixés à l'acide acétique à 5%.

La révélation des protéines est effectuée par coloration à l'aide d'une solution de Bleu de Coomassie à 0,1 % dans l'acide acétique à 5%.

Le PM des peroxydases natives a été déterminé par électrophorèse sur plaque de gel de polyacrylamide (gradient en polyacrylamide : 4 --> 30%) en présence des protéines suivantes : tyroglobuline : 670 000 D ; catalase : 240 000 D ; ceruloplasmine : 150 000 D et BSA : 68 000 D., soit par filtration sur gel de Sephadex G200.

Le PM des enzymes en conditions dénaturantes (gel de polyacrylamide + SDS) est estimé par référence à celui de protéines marqueurs mises à migrer dans les mêmes conditions : 3-phosphoglycéraldéhyde kinase (PGK) : 47 000 D ; alcool deshydrogénase (ADH) : 35 000 D ; trypsine inhibiteur du soja (STI) : 21 000 D ; lysozyme (LYS) : 14 400 D.

3. Détermination du pH isoélectrique par électrofocalisation en veine liquide.

L'électrofocalisation en veine liquide a été effectuée à l'aide d'une colonne LKB 810 (volume utile: 110 ml) contenant 4 ml d'un mélange d'ampholines permettant l'établissement du gradient de pH désiré stabilisé par un gradient linéaire de concentration en saccharose (5 à 45%). Chaque expérimentation est conduite durant 3 jours à 4°C, sous une tension de 400 V. Des fractions de 1,2 ml sont récoltées et sur chacune d'elles sont mesurés le pH (à température ambiante) et l'activité enzymatique.

V. DEGRADATION DU BOIS

1 Matériel végétal

a) Etude in vitro

Les études de dégradation du bois sont réalisées sur des bûchettes placées en tubes de Roux ou dans des fioles d'Erlenmeyer selon les techniques déjà décrites. Sur ces cultures sont effectuées :

- * L'estimation de la perte en poids, mesure rendant compte du pouvoir dégradatif global des différents champignons.;

- * La détermination du taux de lignine dans les résidus de bûchette

- * La composition monomérique de la lignine du résidu de bûchette; ce dosage effectué dans le but de déterminer les modifications éventuelles dues à la

dégradation du polymère par les agents pathogènes. Pour toutes ces mesures le témoin est constitué par des bûchettes stérilisées non inoculées.

b) Etude in vivo

Seuls le dosage de lignine et l'analyse de la composition monomérique sont effectués sur les tissus prélevés sur des pivots adultes naturellement infectés en plantation. Pour les raisons indiquées précédemment les études sont réalisées sur des pivots partiellement colonisés ; pour chaque pivot, l'échantillon de tissus sains S tient lieu de témoin et donc de base de comparaison pour les autres types de tissus: SF (tissus sains proches du front de progression des parasites), PF (tissus infectés prélevés au niveau du front) et P (tissus infectés éloignés du front). Les échantillons de tissus sont prélevés selon la technique déjà indiquée, puis séchés durant 48 h. à 45°C.

2. Méthodes analytiques

a) Estimation de la perte en poids

L'aptitude à dégrader le bois est estimée par la perte de "matière sèche" des bûchettes, en fonction du temps de culture. Les mesures de poids sec sont réalisées sur les bûchettes, débarrassées de leur gangue mycélienne, après séchage en étuve à 45°C durant 48 heures. Cette procédure est préférée à celle du séchage classique à 105°C afin d'éviter toute éventuelle modification chimique des polymères pariétaux par un chauffage trop long et trop intense des résidus de bûchettes, ceux-ci étant ultérieurement utilisés pour les dosages de lignine. L'humidité résiduelle de telles bûchettes est inférieure à 5%. Les résultats sont exprimés en pourcentage de "perte en poids" par rapport au P. S. (45°) initial des bûchettes, diminuée de celle correspondant à la perte résultant de l'autoclavage des bûchettes (estimation faite sur un lot témoin).

b) Epuisement du bois en substances extractibles

Après séchage, les échantillons de tissus (bûchettes ou tissus racinaires) sont broyés (broyeur à couteaux) de manière à obtenir une sciure dont les particules ont une taille inférieure à 60 mesh. Celle-ci est débarrassée des "extractibles" selon la procédure suivante : extraction à l'eau chaude (95°C, 12 h), puis à l'oxalate d'ammonium à 0,5 % (85°C, 24 h), enfin au carbonate de sodium à 2 % (85°C, 8 heures) ; dans tous les cas les extractions sont réalisées à raison de 50 ml de solution par gramme de sciure. Après la dernière extraction, la sciure est rincée à l'eau chaude jusqu'à neutralité, puis séchée à 45°C et enfin réextraite au Soxhlet successivement par un mélange alcool-benzène (1/2 ; V/V), puis par l'alcool à 95% durant 8 heures. Le résidu constitue, après séchage, le matériel sur lequel seront réalisés les dosages de lignine et la détermination de composition monomérique de celle-ci.

c) Dosage de la lignine

1° Considérations générales sur la méthodologie

Différentes méthodes de dosage de la lignine ont été utilisées par divers auteurs, parmi lesquelles les plus connues sont :

- le dosage de la "lignine de Klason" (ou lignine sulfurique; méthode gravimétrique);
- la digestion du bois par le bromure d'acétyle suivie d'un dosage spectrophotométrique de la solution obtenue;
- le dosage par extraction quantitative à l'acide thioglycolique (gravimétrie).

Chacune de ces méthodes présente des avantages et des inconvénients parmi ces derniers on peut citer :

* Concernant le dosage de la lignine de Klason: la formation éventuelle de produits de condensation avec les protéines et d'autres composés du bois, conduisant à une surestimation du taux de lignine ; ou bien, au contraire, la présence dans le bois de lignines solubles dans l'acide sulfurique à 72%, la proportion de cette lignine échappant ainsi au dosage peut varier en fonction de l'origine du bois ou de son degré d'altération par les pathogènes et, de ce fait, introduire une nouvelle source d'erreur.

* La méthode au bromure d'acétyle nécessite de travailler sur un matériel parfaitement débarrassé des "extractibles" de nature phénolique qui conduirait à une surestimation des quantités de lignine. Par ailleurs ce dosage n'est pas très précis ; la variabilité des résultats est telle qu'elle entraîne la nécessité de multiplier les prises d'essais (5 à 6 par échantillon) pour obtenir une valeur moyenne fiable.

*La méthode à l'acide thioglycolique présente l'inconvénient de greffer un composé organique sur la lignine (substitution des hydroxyles de la chaîne latérale des unités phénylpropanes par le groupe (-S-CH₂-COOH); c'est cette substitution qui rend la lignine soluble dans les solutions alcalines). Le taux de groupements substituables varie suivant le type de lignine et, vraisemblablement, suivant le type ou l'intensité de l'altération subie par la macromolécule au cours de l'attaque parasitaire. La variation du nombre moyen de groupes thioglycoliques par monomère de la lignine se répercutera automatiquement sur les mesures pondérales de la lignine ainsi extraite.

Cependant, d'après VANCE et al. (1980), l'utilisation de cette technique mérite d'être développée. En effet elle ne provoque pas de condensation entre la lignine et les autres polymères de la paroi. Par ailleurs d'après LAI et SARKANEN (1971) elle conduit à l'isolement d'une lignine, certes modifiée chimiquement, mais respectant le mieux possible la composition monomérique de la macromolécule naturelle.

Les résultats des dosages étant relativement homogènes, il est possible de réduire le nombre de prises d'essais par échantillon (2 ou 3).

Tableau 2

Analyse de la lignine du bois: résultats comparatifs des dosages effectués par trois techniques différentes:

A - Dispersion des résultats en fonction de la technique de dosage

	Techniques de dosage		
	Bromure d'acétyle	Klason	LTG
Nombre de répétitions par échantillon	5	4	3
S	27	20,5	22,3
	28,2	22,2	23,3
	28,4	19,3	21,7
	28,8	21,9	
	29,9		
	M 28,5 ± 1	21,0 ± 1,3	22,0 ± 0,3
SF	29,6	19,7	22,2
	29,3	22,2	21,8
	29,5	23,6	21,9
	29,8	21,1	
	30,2		
	M 29,7 ± 0,4	21,7 ± 1,6	22,0 ± 0,2

B - Taux de lignine: résultats comparatifs fournis par les trois techniques:

	Bromure d'acétyle	Klason	LTG
Pivot A			
S	28,6	21,0	20,9
SF	29,7	21,6	21,6
PF	29,5	27,1	22,0
P	27,9	20,6	18,2
Pivot B			
S	29,4	22,2	22,2
PF	31,6	23,8	23,6
P	34,0	24,0	25,0

Les résultats sont exprimés en pourcentage de lignine calculé par rapport au poids de matière sèche de l'échantillon. S: tissus sains; SF: tissus sains du front de progression du parasite; PF: tissus parasités du front; P: tissus anciennement colonisés.

Les tableaux 2 A et B présentent les résultats d'une comparaison entre les trois méthodes de dosages. On note en particulier la grande homogénéité des dosages par l'acide thioglycolique (Tabl. 2a). Le Tableau 2b montre que les résultats enregistrés par les trois techniques sont qualitativement comparables (les variations "évoluent dans le même sens") ; en revanche les valeurs quantitatives et l'amplitude des variations diffère dans des proportions considérables d'une méthode à l'autre. Enfin la technique de Klason et celle à l'acide thioglycolique conduisent à des résultats quantitatifs comparables, alors que la méthode au bromure d'acétyle fournit des valeurs nettement plus élevées.

Toutes ces considérations nous ont conduit à choisir la méthode basée sur l'extraction par l'acide thioglycolique pour les dosages de lignine effectués au cours de ce travail.

2° Dosage de la lignine par extraction quantitative à l'acide thioglycolique.

La lignine est extraite quantitativement à partir de 250 mg de sciure 60 mesh (débarassée des extractibles) dans les conditions suivantes: extraction par un mélange de 0,4 ml d'acide thioglycolique et 5 ml d'HCl durant 5 heures à 90°C. Cette suspension est filtrée sur verre fritté n° 5 ; le résidu est lavé à l'eau, puis remis en suspension dans 5 ml de NaOH 2 % durant 24 heures à température ambiante. Elle est ensuite filtrée sur verre fritté n°5 et le résidu lavé à deux reprises par 5 ml d'eau. Filtrat et eaux de lavage sont regroupés dans un tube à centrifuger préalablement pesé (tare), amenés à pH 1,5 par une solution d'HCl 5N entraînant la floculation de la lignine thioglycolique.

Le floculat est centrifugé (10 minutes à 15 000 G) et le culot est lavé à deux reprises par 5 ml d'eau. Le culot obtenu après la dernière centrifugation est séché à 80°C durant 48 heures et pesé. Le résultat est exprimé en pourcentage de lignine (sous sa forme thioglycolique) par rapport au poids sec de matériel initial (P.S. à 105°C estimé sur échantillon du matériel préalablement séché à 45°C durant 48 heures puis porté 48 heures à 105°C). Il est à noter que cette lignine thioglycolique est soluble non seulement en milieu alcalin mais également dans une solution de phosphate de sodium à pH 6.

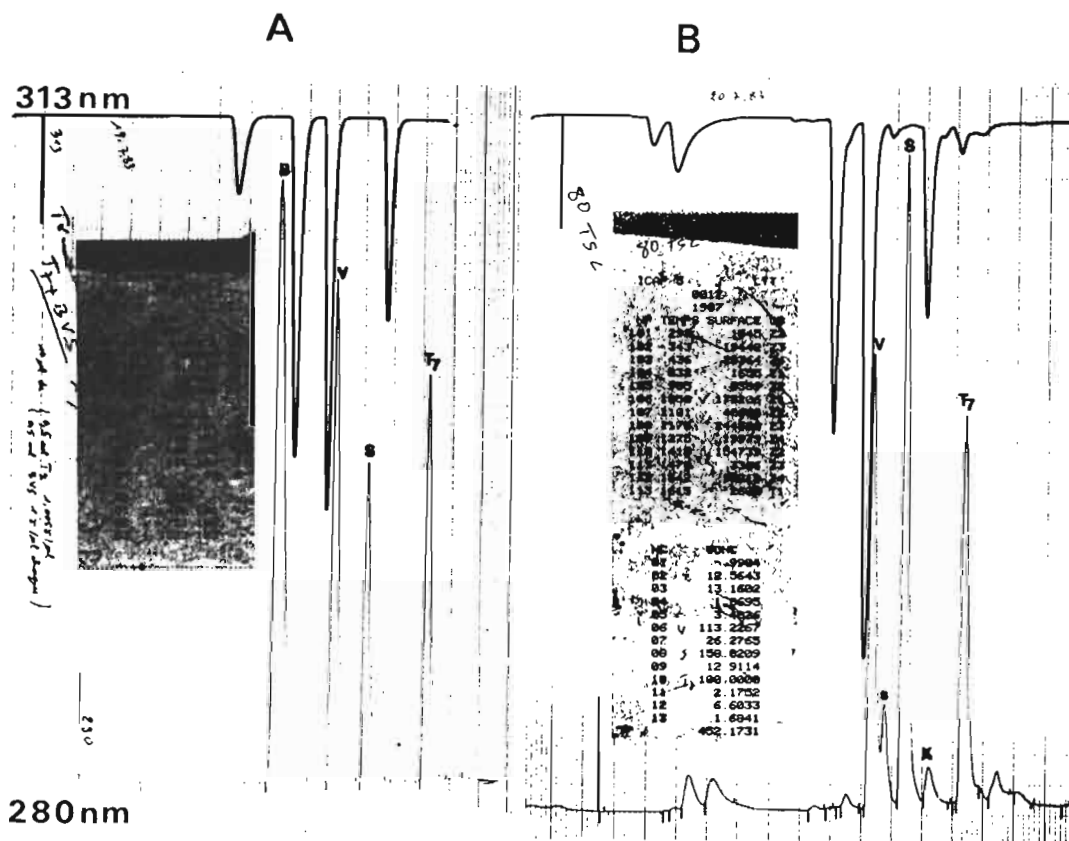
d) Composition monomérique de la lignine

1° Technique

* Oxydation au nitrobenzène alcalin

L'analyse monomérique est réalisée après oxydation de la sciure au nitrobenzène alcalin qui provoque la rupture de la molécule et libère les

Figure 3 - Enregistrement graphique d'une séparation par HPLC des aldéhydes de la série benzoïque. **A)** composés témoins; **B)** échantillon obtenu par oxydation au nitrobenzène d'une sciure de tissu S.



L'enregistrement est effectué en parallèle à deux longueurs d'onde: 313 et 280nm. B= p-hydroxybenzaldéhyde; S= syringaldéhyde; V= vaniline; s= acide syringique; X= composé non identifié.

monomères sous la forme d'aldéhydes de la série benzoïque; l'analyse est effectuée dans les conditions suivantes (technique dérivée de celle de HARTLEY (1971)) : 250 mg de sciure débarassée des extractibles sont mis en suspension dans un mélange de 0,5 ml de nitrobenzène et de 5 ml NaOH 2 N. L'oxydation est effectuée, sous agitation intermittente, durant 3 h à 160°C, dans un tube en acier inoxydable hermétiquement bouché. La suspension est alors refroidie, puis filtrée sur verre fritté N° 3 et le résidu est lavé par 3 x 5 ml d'eau, puis par 2 x 20 ml d'éther. Filtrat et solutions de lavage sont versés dans une ampoule à décanter et extraits par 2 x 40 ml d'éther de manière à éliminer l'excès de nitrobenzène. Puis la phase aqueuse est amenée à pH 2,5 par une solution d'HCl 5 N, saturée en NaCl et enfin extraite à deux reprises par 60 ml d'éther. La phase étherée est recueillie et filtrée sur Na₂SO₄ anhydre. Enfin le solvant est évaporé sec et le résidu repris par 3 x 2 ml de méthanol pur.

* Identification et dosage quantitatif des aldéhydes de la série benzoïque

L'analyse monomérique est réalisée sur cette solution méthanolique. Les aldéhydes de la série benzoïque, résultant de l'oxydation de la lignine sont séparées en HPLC (High Performance Liquid Chromatography) sur colonne "C 18" à l'aide d'un appareillage WATERS, dans les conditions suivantes : gradient : de méthanol 5 ---> 45% (dans de l'acide acétique à 1 %) ; débit : 1 ml/mn ; temps d'établissement du gradient : 15 minutes ; standard interne : T7 (=3,4,5-triméthoxybenzaldéhyde) à 0,5 mg par ml de solution injectée ; volume de la prise d'essai : 5 à 10 µl.

Les essais (Fig. 3) révèlent que l'oxydation au nitrobenzène effectuée sur la sciure extraite conduit à un nombre réduit de composés phénoliques parmi lesquels prédominent la vaniline et la syringaldéhyde. A noter l'absence quasi totale de p-hydroxybenzaldéhyde et la présence d'un composé X, non identifié, élué entre le pic S et le standard T7. Dans quelques rares échantillons le pic X était aussi important que les pics S ou V. Enfin les conditions d'élution proposées ont toujours été respectées, le simple changement de débit (1 ---> 2 ml/mn) provoque la superposition des pics S et V.

La pureté des pics V et surtout S est appréciée grâce à l'enregistrement de la DO à 280 et 313 nm ; le rapport 313/280 (rapport de la "hauteur" des pics) fournit une bonne indication à ce sujet. Lors d'une analyse portant sur 20 échantillons de sciure provenant de différents types de tissus (S, SF, PF et P) les valeurs ci-dessous ont été calculées pour le rapport DO_{313}/DO_{280} :

Tableau 3 - Composition monomérique de la lignine: variabilité au niveau des rendements de l'oxydation de la sciure au nitrobenzène; stabilité des rapports S/V.

		Pivot 1 (<i>R. lignosus</i>)			Pivot 2 (<i>P. noxius</i>)			Pivot 3 (sain)		
		V*	S*	S/V	V*	S*	S/V	V*	S*	S/V
TS	1	2,41	4,79	1,98	2,57	4,3	1,67	2,0	4,7	2,35
	2	2,86	5,34	1,87	2,85	4,78	1,68	2,32	5,56	2,39
	3	-	-	-	-	-	-	2,3	5,5	2,39
	4	-	-	-	-	-	-	2,0	4,8	2,40
TSF	1	2,65	5,0	1,89	2,1	4,19	1,98	-	-	-
	2	2,83	5,3	1,87	2,78	5,76	2,07	-	-	-
TPF	1	1,85	3,27	1,77	2,19	4,89	2,23	-	-	-
	2	2,94	5,2	1,77	2,24	5,23	2,33	-	-	-
TP	1	1,82	2,57	1,41	1,97	3,74	1,89	-	-	-
	2	2,65	4,0	1,50	2,5	4,68	1,87	-	-	-

* Valeurs exprimées en pourcentage par rapport au poids sec (105°) de sciure.

	Rapport :DO ₃₁₃ /DO ₂₈₀		
	V	S	T7
Echantillons de sciure (*)	0,69	1,19	0,48
	0,01	0,06	0,00
Etalon expérience 1	0,69	1,38	0,45
	expérience 2	0,68	1,35

On note que la syringaldéhyde est légèrement contaminée par un composé entraînant la réduction du rapport DO₃₁₃/DO₂₈₀. Les pics (Fig. 3) sont cependant très symétriques et la dispersion des valeurs du rapport est faible indiquant que la contamination du pic S est dans tous les échantillons. Les conclusions des études comparatives ne seront donc pas affectées par cette légère (et systématique) contamination de la syringaldéhyde.

2° Expression des résultats

Les résultats sont exprimés uniquement sous la forme du rapport S/V, (rapport molaire) indiquant des variations relatives entre ces deux monomères. La p-hydroxybenzaldéhyde (B) n'a pas été prise en considération, quantitativement elle est toujours négligeable par rapport aux deux autres aldéhydes (0,6 à 1% par rapport à la somme : B + V + S).

Nous n'avons pas cherché à exprimer les quantités d'aldéhydes par rapport au poids de sciure soumis à l'oxydation en raison des incertitudes concernant les rendements et la reproductibilité de la réaction d'oxydation.

Concernant ce dernier aspect il convient de noter (Tableau 3) que les résultats d'analyse d'un même échantillon sont souvent dispersés (surtout dans le cas d'échantillons de tissus parasités), alors que les rapports S/V sont au contraire très homogènes. Ceci signifie que si les rendements de l'oxydation sont variables, par contre ces variations sont identiques pour S et V. Il en résulte que les variations des rapports S/V enregistrées pour différents types de tissus ont une réelle signification.

V. AUTRES TECHNIQUES ANALYTIQUES

1. Séparation des oses et oligosides par chromatographie sur gel de silice

La séparation des sucres résultant de la dégradation de la lignocellulose par les filtrats de culture de *R. lignosus* et *P. noxius* (milieu réactionnel : lignocellulose 1 % en suspension dans un tampon citrate 0,0125 M pH 4,6 + filtrat de culture en quantité variable) est réalisée par chromatographie sur plaque de gel de silice de 0,25 mm d'épaisseur (precoated TLC plates Silica gel 60 ; Merk). Volume de dépôt : 10 μ l du milieu réactionnel, 5 μ l pour les sucre-témoins en solution à 0,01M dans de l'eau distillée. Solvant de migration : propanol-eau : 85/15 (v/v) (l'acide galacturonique migre très peu dans ce système) ou Butanol - acide acétique-eau : 4/2/3. Révélation des chromatogrammes : après pulvérisation du révélateur (diphénylamine à 1 % dans de l'acétone : 100 ml + 1 ml d'aniline + 10 ml d'acide orthophosphorique 85 %) les plaques sont chauffées à 105°C durant 5 à 10 minutes. Les sucres sont révélés sous forme de spots bleu-foncé sur fond blanc.

2. Finger-print tryptique des protéines des peroxydases purifiées

Les peroxydases purifiées sont dialysées contre de l'acide acétique à 0,5% puis lyophilisées. L'hydrolyse par la trypsine est réalisée dans les conditions suivantes: deux additions, à deux heures d'intervalle, d'une quantité de trypsine correspondant à 1/50 du poids de protéine à hydrolyser; temps d'hydrolyse total: 4h en tampon ambic 0,001M à 37°C. L'hydrolysate est lyophilisé puis repris par 20 μ l d'acide acétique à 10%. Dépôt sur la plaque: 10 μ l, suivi d'une séparation bidimensionnelle: 1: électrophorèse sous 400 V durant 90 mn dans le système : pyridine 10 ml + ac. acétique: 20 ml + acétone: 75 ml + eau: 395 ml. 2: chromatographie dans le système: pyridine: 100 ml + ac. acétique: 30 ml + n-butanol: 150 ml + eau: 120 ml.

CHAPITRE I

MODIFICATIONS DE QUELQUES ACTIVITES ENZYMATIQUES ACCOMPAGNANT L'ATTAQUE PARASITAIRE ; SIGNIFICATION DE CES PERTURBATIONS.

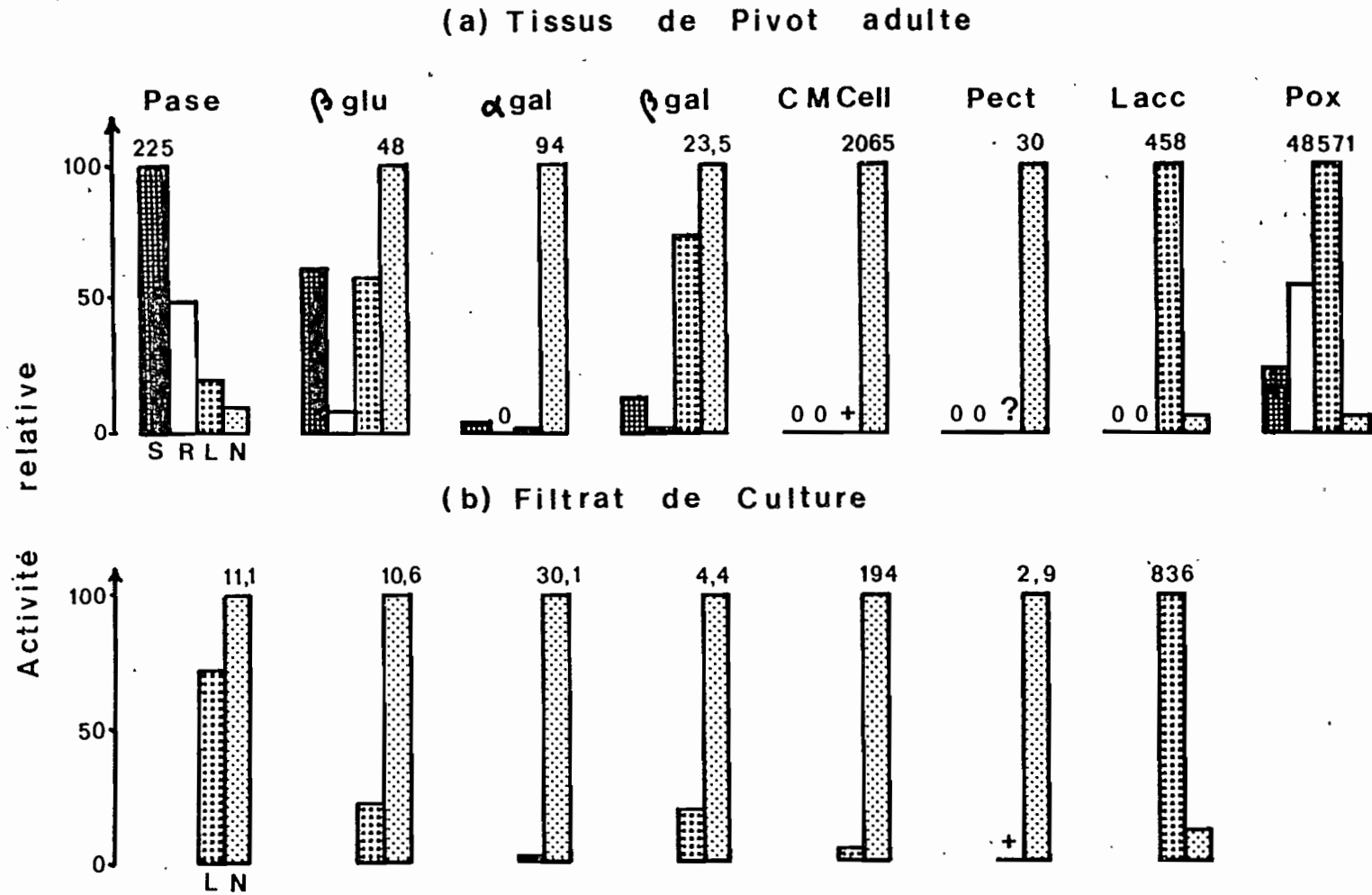
L'objectif de cette premiere approche est triple :

- effectuer un inventaire des perturbations accompagnant l'agression des racines d'Hévéa par *R. lignosus* et *P. noxius* ;
- vérifier si les perturbations induites au niveau des tissus de l'hôte sont spécifiques de chaque parasite ;
- préciser la signification probable de ces perturbations, enzymes de "réaction" de l'Hévéa ou enzymes d'"agression", en déterminant l'origine de ces enzymes présentes dans les tissus parasités.

I. PERTURBATIONS ACCOMPAGNANT L'ATTAQUE PARASITAIRE.

Cette investigation s'avérait indispensable du fait qu'aucune donnée n'était disponible, dans ce domaine, sur les couples Hévéa-*R. lignosus* ou *P. noxius*. De manière plus générale ce type d'étude n'a été effectué qu'exceptionnellement dans le cas de couples hôte-parasites où l'hôte est un organe ou un tissu lignifié de plante arbustive et le parasite un agent de pourriture du bois. Ainsi SHAIN (1971) aborda l'étude de la répartition de la laccase selon la nature des tissus (sain, réactionnel ou nécrotique) pour le couple *Epicea-Fomes annosus*. JOHANSSON et THEANDER (1974) étudièrent la répartition des activités : o- et p-diphénoloxydases et peroxydase chez le même couple hôte-parasites. Enfin WOODS et HOLME (1974) montrèrent que l'activité pectinolytique était beaucoup plus active dans les tissus de l'aune parasités par *Ceratocystis ulmi* que dans les tissus sains correspondants. Cependant dans la très grande majorité des cas les recherches effectuées *in vivo* sur des organes lignifiés de plantes arbustives attaquées par des agents pathogènes concernaient des modifications de l'équilibre ionique (SHAIN, 1971 ; JOHANSSON et THEANDER, 1974) ou phénolique (SHAIN et HILLIS, 1971), l'effet d'"extractibles" sur l'activité d'enzymes excrétées par des agents pathogènes (JOHANSSON et al., 1974 ; CERNY, 1973) ou l'action fongitoxique de tels extractibles (HUBBES et Mc GAULEY, 1976 ; JENG et al., 1983 ; POPOFF et ELGERSMA, 1973) et la formation du

Figure 4 - Comparaison des activités enzymatiques présentes dans différents types de tissu (a) et filtrats de culture (b).



(a): S= tissus sains; R= tissus de réaction; L = tissus parasités par *R. lignosus*; N= tissus parasités par *P. noxius*; nombre de répétitions: S: 8; R: 6; L: 3 (sauf pour l'activité peroxydasique (Pox): 21b); N: 8. (b): L= filtrat de culture de *R. lignosus*; N = filtrat de culture de *P. noxius* Nombre de répétitions: L: 3; N: 4.

"bois humide" (WORRAL et PARMETER, 1982). On note enfin des tentatives ayant pour but de corréler activités enzymatiques testées *in vitro* et pouvoir pathogène de certaines souches de champignons (SVALDI et al., 1981 ; ELGERSMA, 1976).

Concernant les couples Hévée-*R. lignosus* et Hévée-*P. noxius*, nous avons entrepris de comparer l'équipement enzymatique de quatre types de tissus ; tissus sains (S), tissus parasités par *R. lignosus* (L), tissus parasités par *P. noxius* (N) et tissus réactionnels (R) formés par l'Hévée en réaction à l'infection par *R. lignosus* ou plus fréquemment, par *Sphaerostylbe repens*. Les tissus (R) ne sont pas colonisés par les parasites. Cependant du fait des conditions particulières de leur formation ils sont susceptibles d'être le siège de perturbations biochimiques et donc de se différencier d'un tissu sain "normal". Enfin l'analyse des perturbations a été effectuée pour les huit activités enzymatiques suivantes : phosphatase acide b-glucosidase, a- et b-galactosidase, carboxyméthyl-cellulase, pectinase, laccase et peroxydase.

Résultats

L'histogramme (Fig. 4a) révèle que, de manière très globale, les tissus parasités sont plus "riches" en activités enzymatiques que les tissus sains ou réactionnels. Cette différence se situe non seulement au plan quantitatif mais également qualitatif :

* **Au plan qualitatif** : trois enzymes (CM-cellulase, pectinase et laccase, dont on peut présumer l'incidence majeure dans le déroulement de la pathogénèse, ne sont présentes (ou dosables) que dans les tissus parasités.

* **Au plan quantitatif** : à l'exception de la phosphatase et, partiellement, de la b-glucosidase, le niveau d'activité des enzymes des tissus infectés est très supérieur à celui des enzymes homologues extraites des tissus sains ou réactionnels.

D'autres comparaisons sont possibles :

a) Tissus sains --> tissus de réaction

Les activités enzymatiques des extraits de tissus réactionnels sont inférieures à celles des extraits de tissus sains. Si l'on considère les phosphatases et les glycosidases comme des témoins d'une activité lytique, il paraît logique que les tissus de réaction, en pleine extension, soient, moins que tout autre, le siège d'altérations de ses polymères structuraux.

De même l'augmentation de l'activité de la peroxydase peut s'expliquer dans la mesure où cette enzyme participe (ceci reste néanmoins à démontrer) à la synthèse de la fraction lignine des parois de ces tissus.

b) Tissus parasités par *R. lignosus* ---> tissus parasités par *P. noxius*.

De manière très générale et si l'on excepte le cas des phosphatases, l'activité de l'ensemble des enzymes hydrolytiques est plus élevée dans les tissus parasités par *P. noxius* que dans ceux infectés par *R. lignosus*. Cette différence est particulièrement nette pour les activités α -galactosidase CM-cellulase et pectinase. En revanche la situation est totalement inversée en ce qui concerne les enzymes à caractère oxydasique : laccase et peroxydase.

Les résultats enregistrés au cours de cette approche globale montrent donc clairement que **l'agression parasitaire provoque, au sein des tissus de l'Hévéa, une perturbation de l'équipement enzymatique à la fois aux plans qualitatif et quantitatif. L'amplitude de cette perturbation est fonction de :**

- la nature de l'activité enzymatique
- et, pour chacune de ces activités, de l'identité de l'agent pathogène infectant.

Cette corrélation entre les modifications métaboliques identifiées dans les tissus et l'agression parasitaire ne permet cependant pas, à ce stade, de préciser la signification des perturbations. L'augmentation de l'activité enzymatique dans les tissus infectés peut en effet avoir deux origines différentes ayant des implications opposées au plan du processus pathogénique :

- Réaction de l'hôte : s'il en est ainsi, l'accroissement des activités enzymatiques où l'"apparition" d'enzymes nouvelles résulterait respectivement d'une stimulation de la biosynthèse d'enzymes initialement présentes dans les tissus sains, ou de l'induction de la biosynthèse de protéines originellement reprimée dans ces tissus. Les enzymes concernées pourraient participer aux mécanismes de défense de l'hôte contre le parasite notamment en dégradant les polymères de structure de la paroi mycélienne. Un tel mécanisme a en effet été mis en évidence dans le cas de la β (1 \rightarrow 3)-glucanase (PEGG, 1977 ; WARGO, 1975).
- Excrétion, dans les tissus de l'hôte, d'enzymes produites par le parasite : ces enzymes participeraient alors à la pathogénèse en dégradant les polymères des tissus envahis. C'est l'hypothèse la plus fréquemment proposée et vérifiée (ALBERSHEIM *et al.*, 1969).

Le cas de certaines β (1 \rightarrow 3)-glucanases illustre parfaitement cette dualité : synthétisée par la plantule de tomate, elles dégradent les β (1 \rightarrow 3)-glucanes du parasite *Verticillium albo-atrum* (PEGG et YOUNG, 1981; YOUNG et PEGG, 1981).; synthétisées par *Colletotrichum lagenarium*, elles dégradent les glucanes des tissus du melon (RABENANTOANDRO *et al.*, 1976).

C'est pourquoi il était indispensable de vérifier, par des méthodes directes ou indirectes, l'origine des enzymes présentes dans les tissus parasités.

II. ORIGINE DES ENZYMES PRESENTES DANS LES TISSUS PARASITES.

Cette vérification a été conduite en plusieurs étapes. Les deux premières (la comparaison entre le niveau d'activité des enzymes des tissus parasités et celui des filtrats de culture et l'examen de la répartition spatiale des enzymes au sein des pivots) permettent d'apporter une réponse partielle à la question. La troisième, réservée aux cas litigieux, consiste en une comparaison directe, par électrophorèse, des enzymes respectivement extraites des tissus parasités et de celles contenues dans les filtrats de culture des champignons.

1. COMPARAISON ENTRE ACTIVITES ENZYMATIQUES MESUREES *IN VIVO* (PIVOT D'HEVEA) ET *IN VITRO* (FILTRAT DE CULTURE).

L'information la plus significative fournie par l'analyse des tissus racinaires réside dans le fait que certaines enzymes sont exclusivement présentes dans les tissus parasités. L'hypothèse la plus vraisemblable est que ces enzymes sont synthétisées par le parasite et non par l'hôte. Encore fallait-il vérifier que les champignons soient bien capables d'en effectuer la biosynthèse.

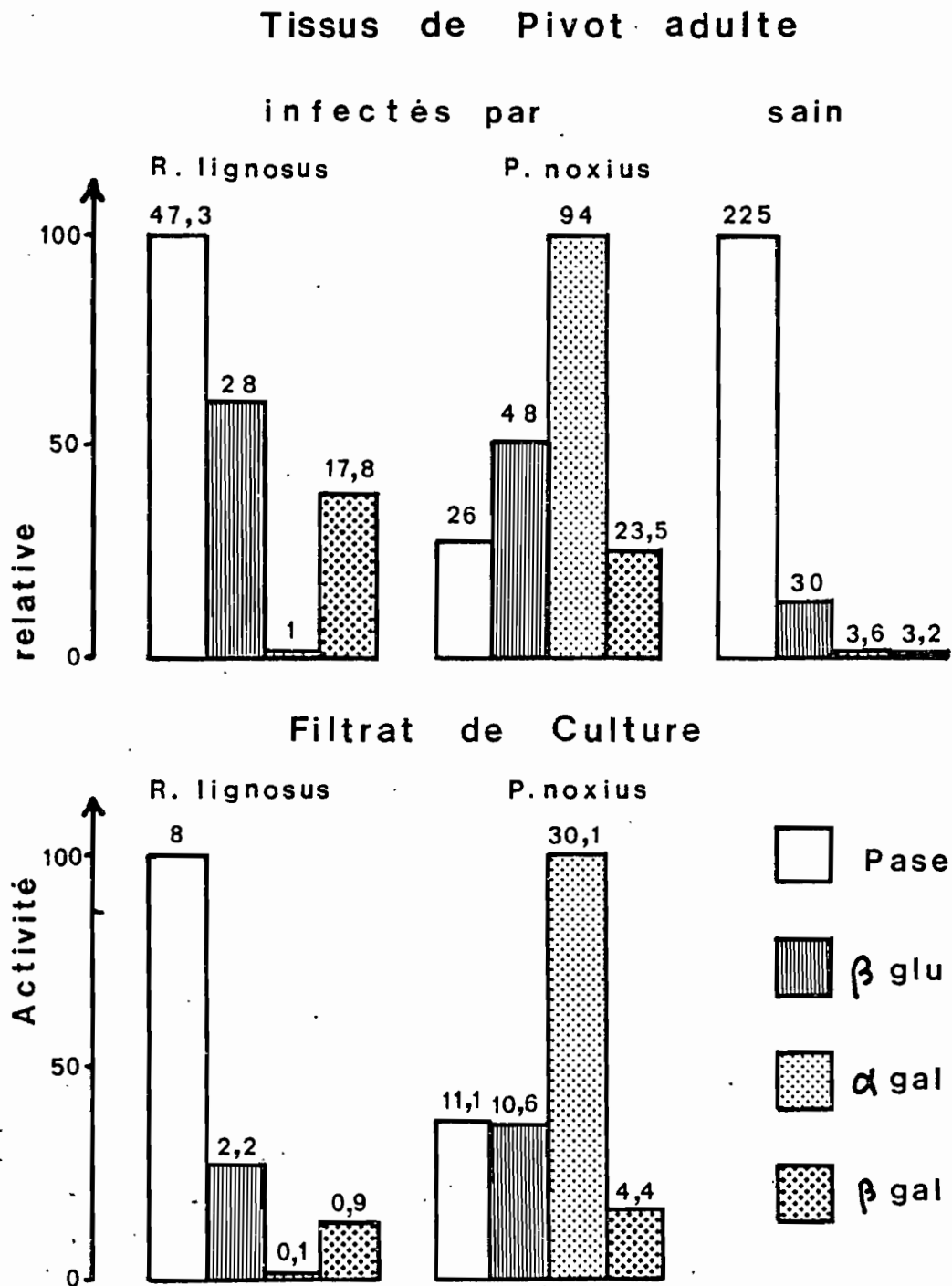
La figure 4b montre que ces enzymes (CM-cellulase, pectinase et laccase) sont bien excrétées *in vitro* par les parasites. De plus les capacités d'excrétion manifestées par *R. lignosus* et *P. noxius* reflètent les niveaux d'activité enregistrés, pour les trois types d'enzymes, dans les tissus parasités respectivement par ces agents pathogènes. Ainsi l'activité laccase est bien plus élevée dans les cas (filtrat de culture et tissus parasités) où se trouve impliqué *R. lignosus*, que dans ceux impliquant la présence de *P. noxius*. La situation est inversée pour les activités CM-cellulase et pectinase.

Ces deux observations, absence des trois enzymes des tissus sains et homologie entre tissus parasités et filtrats de culture, suggèrent que l'augmentation de l'activité des CM-Cellulase, pectinase et laccase des tissus infectés ne résulte pas d'une manifestation réactionnelle de l'hôte mais d'une excrétion par les parasites des protéines enzymatiques correspondantes.

Les quatre activités enzymatiques: phosphatase, b-glucosidase, a- et b-galactosidases, sont présentes dans les tissus sains (Fig. 4a) et dans les filtrats de culture (Fig. 4b). Les enzymes correspondantes des tissus parasités peuvent donc avoir pour origine soit l'hôte, soit le parasite (soit les deux en cas de coexistence des deux types d'enzyme).

Pendant la comparaison des niveaux d'activité relatifs des quatre enzymes suivant leur provenance :

Figure 5 - Etude comparative de l'activité des phosphatases acides, α - et β -galactosidases et β -glucosidases dans: les tissus sains, les extraits de tissus infectés respectivement par *R. lignosus* et *P. noxius* et les filtrats de culture des mêmes champignons.



- Tissus parasités par *R. lignosus* <--> filtrat de culture de *R. lignosus*,
- Tissus parasités par *P. noxius* <--> filtrat de culture de *P. noxius*

révèle une très nette similitude entre tissus parasités et filtrats de culture homologues. L'histogramme (Fig. 5), réalisé à partir des données recueillies pour les quatre activités enzymatiques mesurées selon des méthodes similaires (activités exprimées dans les mêmes unités), fait clairement apparaître cette homologie. Il est à noter, en outre, que l' α -galactosidase constitue, en première approximation, un caractère spécifique et distinctif de *P. noxius*, tant en culture pure qu'au niveau des tissus infectés.

De façon plus générale, on remarque également que, chez *P. noxius*, l'activité des hydrolases est prédominante par rapport à l'activité laccase ; comme déjà signalée, cette "balance" est inversée pour *R. lignosus*.

L'ensemble de ces données nous conduit à penser que **les activités enzymatiques des tissus parasités sont d'origine fongique**. Au plan des proportions relatives de ces différentes activités les extraits de ces tissus constituent en quelque sorte une empreinte de celle des filtrats de culture homologues.

2. REPARTITION SPATIALE DES ACTIVITES ENZYMATIQUES

Afin de conforter cette hypothèse, nous avons étudié la répartition spatiale des différentes activités enzymatiques dans des pivots partiellement envahis par *R. lignosus* ou *P. noxius*. Cette étude a été réalisée en analysant différents types de tissus prélevés dans des zones caractéristiques des pivots (Fig. 2).

a) Pivot partiellement colonisé par *P. noxius*.

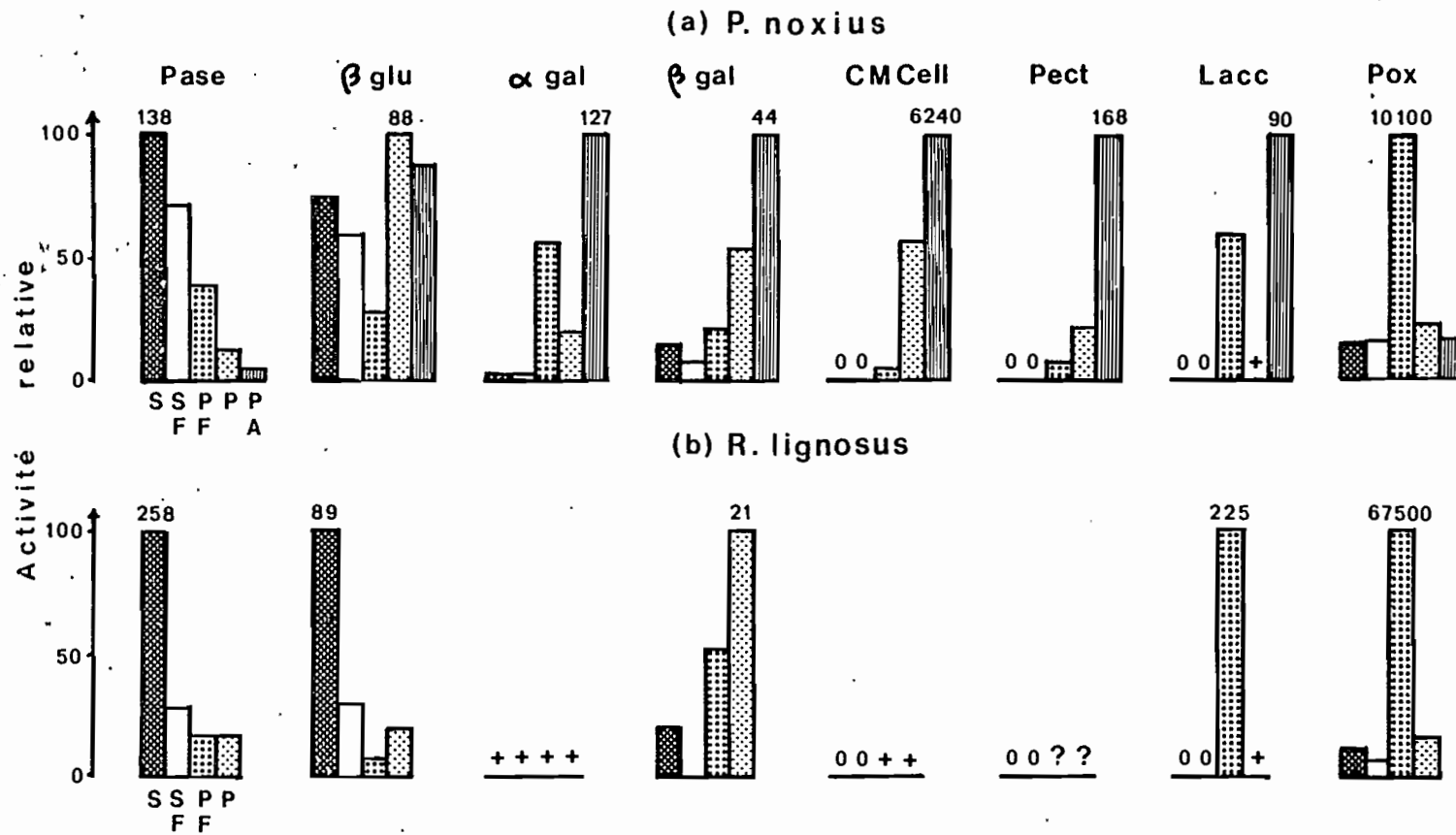
L'histogramme (Fig 6a) révèle au moins trois types de situations suivant l'activité enzymatique considérée.

Le plus fréquemment on observe une augmentation progressive des activités selon la séquence : tissus de type S --> SF --> F --> P --> PA ; c'est-à-dire: tissus sains --> tissus les plus anciennement envahis. Les activités enzymatiques concernées par ce schéma sont les suivantes : β -galactosidase, CM-cellulase, pectinase et, à un moindre degré, α -galactosidase, β -glucosidase et laccase. Notons que les tissus sains ne contiennent ni CM-cellulase, ni pectinase, ni laccase, en accord avec les résultats évoqués plus haut.

Une telle répartition des activités enzymatiques est en faveur d'une "relève", dans les tissus parasités, des enzymes originellement synthétisées par l'hôte dans les tissus sains ; cette relève est assurée par les enzymes excrétées

Figure 6 - Répartition spatiale des activités enzymatiques.

Tissus de Pivot adulte partiellement envahis par



par le parasite. Cette hypothèse est d'autant plus vraisemblable que les tissus de type alvéolaire, siège des activités les plus élevées, sont de toute évidence morts. Ils sont par conséquent incapables d'une réaction exigeant notamment l'intégrité du système responsable de la biosynthèse protéique.

Un second type de situation concerne la phosphatase ; ici le gradient d'activité est inversé ; l'activité diminue suivant la séquence tissus S --> tissus A. On peut donc estimer que l'activité phosphatase des tissus parasités représente simplement une activité résiduelle du pool enzymatique originellement synthétisé par l'hôte et non renouvelé après attaque par les parasites.

Enfin le cas des peroxydases est tout à fait particulier puisque, le long de la séquence tissus S --> tissus A, on observe, au niveau PF, une augmentation brutale de l'activité, suivie d'une chute toute aussi rapide à mesure que l'on s'éloigne vers la zone A. Deux hypothèses peuvent être avancées pour expliquer cette situation:

- Réaction de l'hôte : dans les tous premiers instants de l'agression la biosynthèse des peroxydases est activement stimulée. Au stade ultérieur, suite à la nécrose tissulaire en voie d'installation ce pool peroxydasique n'est plus renouvelé et la chute de l'activité est fonction de la stabilité de l'enzyme.

- Excrétion d'une (ou de plusieurs) peroxydase(s) par le parasite : dans ce cas la sécrétion n'est que transitoire contrairement à ce que l'on observe pour les enzymes cellulolytiques ou pectinolytiques.

Il n'est d'ailleurs pas exclu que les deux phénomènes puissent coexister, *P. noxius* (contrairement à *R. lignosus*) excréant une peroxydase, *in vivo*.

b) Pivot partiellement colonisé par *R. lignosus*

La figure 6b montre que le schéma général décrit pour des pivots attaqués par *P. noxius* est également applicable ici. Les hydrolases (à l'exception de la phosphatase) des tissus parasités sont d'origine fongique.

L'accroissement de l'activité peroxydasique ne résulte vraisemblablement que d'une réaction de l'hôte, *R. lignosus* n'excrétant pas cette enzyme *in vitro* (GEIGER, 1975).

La laccase est vraisemblablement d'origine fongique, la chute brutale de son activité au niveau des tissus P pourrait être attribuée à une inhibition de l'enzyme ou à une répression de sa biosynthèse par des produits de dégradation des tissus ; cette hypothèse reste cependant à vérifier.

Dans le cas particulier de la laccase la réalité de cette répartition spatiale de l'enzyme a pu être démontrée *in situ* par révélation de l'activité enzymatique dans les tissus, après pulvérisation du réactif au gaïacol sur la surface d'un pivot fraîchement tronçonné et dégouché. Le résultat de cette expérience (Fig. 7) montre que l'activité laccase est maximale au voisinage du

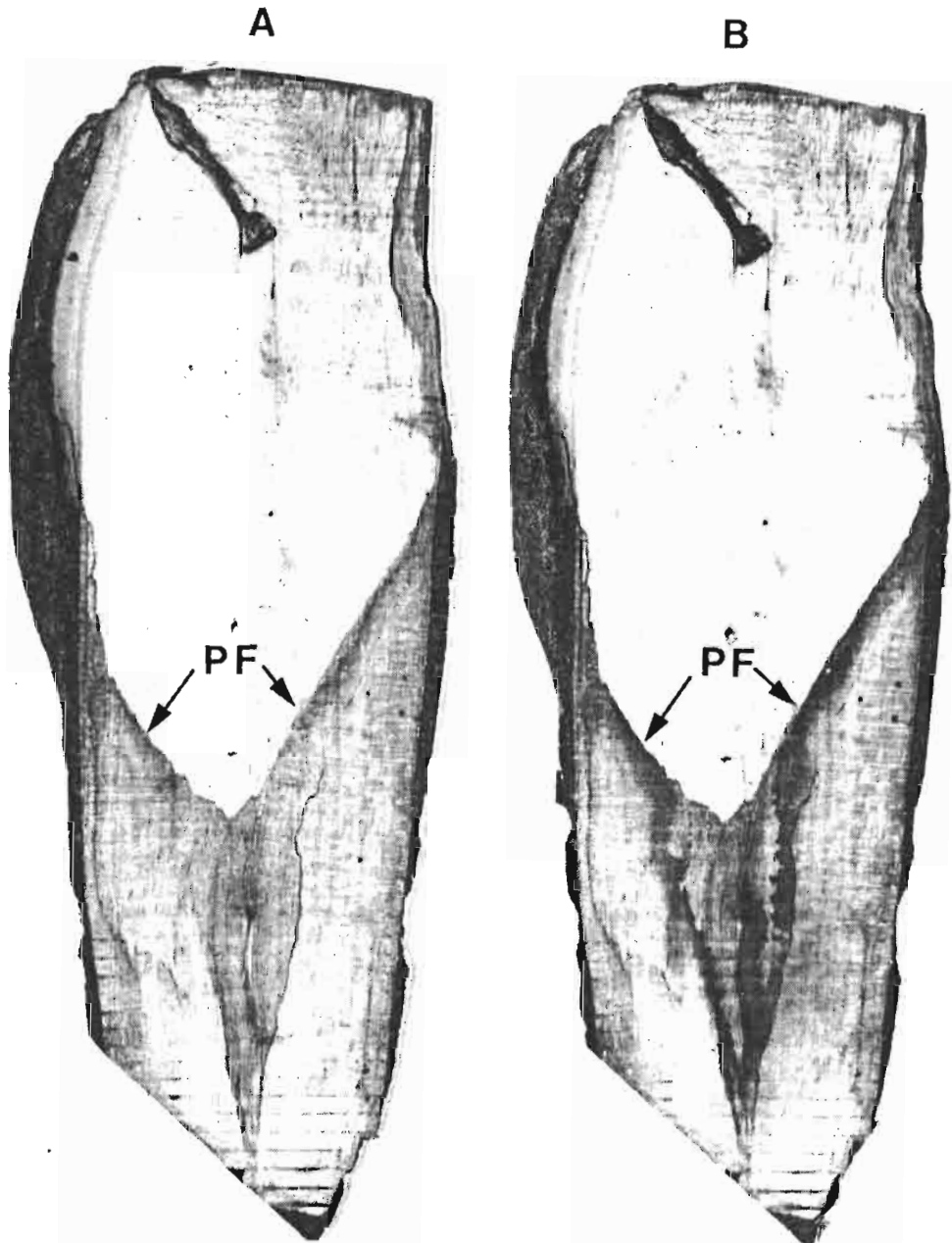


Figure 7 - Répartition spatiale de l'activité laccase au sein d'un pivot infecté par *R. lignosus*. Aspect du pivot avant (A) et après (B) révélation de l'activité enzymatique *in situ* (la révélation est réalisée par pulvérisation du milieu réactionnel sur la surface du pivot fraîchement tronçonné et dégauchi).

front de progression du champignon (zone de tissus PF) et qu'elle est nulle dans les tissus sains.

Des essais similaires ont été réalisés dans le but de mettre en évidence l'activité peroxydasique. Ils ont révélé que cette activité est présente dans l'ensemble du pivot: tissus sains et parasites. Sa répartition n'est cependant pas homogène; l'activité est importante dans la zone S et, surtout, la zone PF, elle est modérée dans la zone P. Pour certains pivots on a noté l'existence d'une "frange" de tissus correspondant à la zone SF où l'activité peroxydasique est anormalement faible. Enfin, au niveau des tissus S la coloration due à l'oxydation enzymatique du gaïacol est transitoire: après quelque temps son intensité diminue. Ceci suggère l'existence, dans ces tissus, d'un système enzymatique ou non enzymatique capable de réduire les produits d'oxydation du gaïacol.

3. VERIFICATION EN ELECTROPHORESE DE L' ORIGINE DE CERTAINES ENZYMES DES TISSUS PARASITES

Cette ultime vérification a été réalisée pour trois types d'enzymes (phosphatase, laccase (*R. lignosus*) et peroxydase) en raison des incertitudes quant à leur origine.

1*) Activité phosphatase

Globalement cinq isoenzymes différentes ont été identifiées (Fig. 8a): trois dans les extraits de tissus sains, une dans les tissus parasites par *R. lignosus* et une dans les tissus infectés par *P. noxius*. Les isoenzymes des tissus parasites sont différentes de celles des tissus sains. L'hypothèse que nous avons proposée plus haut, selon laquelle l'activité phosphatase des tissus parasites serait une activité résiduelle du pool enzymatique préexistant dans les tissus alors qu'ils se trouvaient au stade S ou SF est donc à rejeter. Enfin ce même électrophorégramme, ainsi que le diagramme de la figure 8d, révèle que la nature de l'isophosphatase de chaque type de tissu parasite est spécifique de la nature de l'agent pathogène infectant.

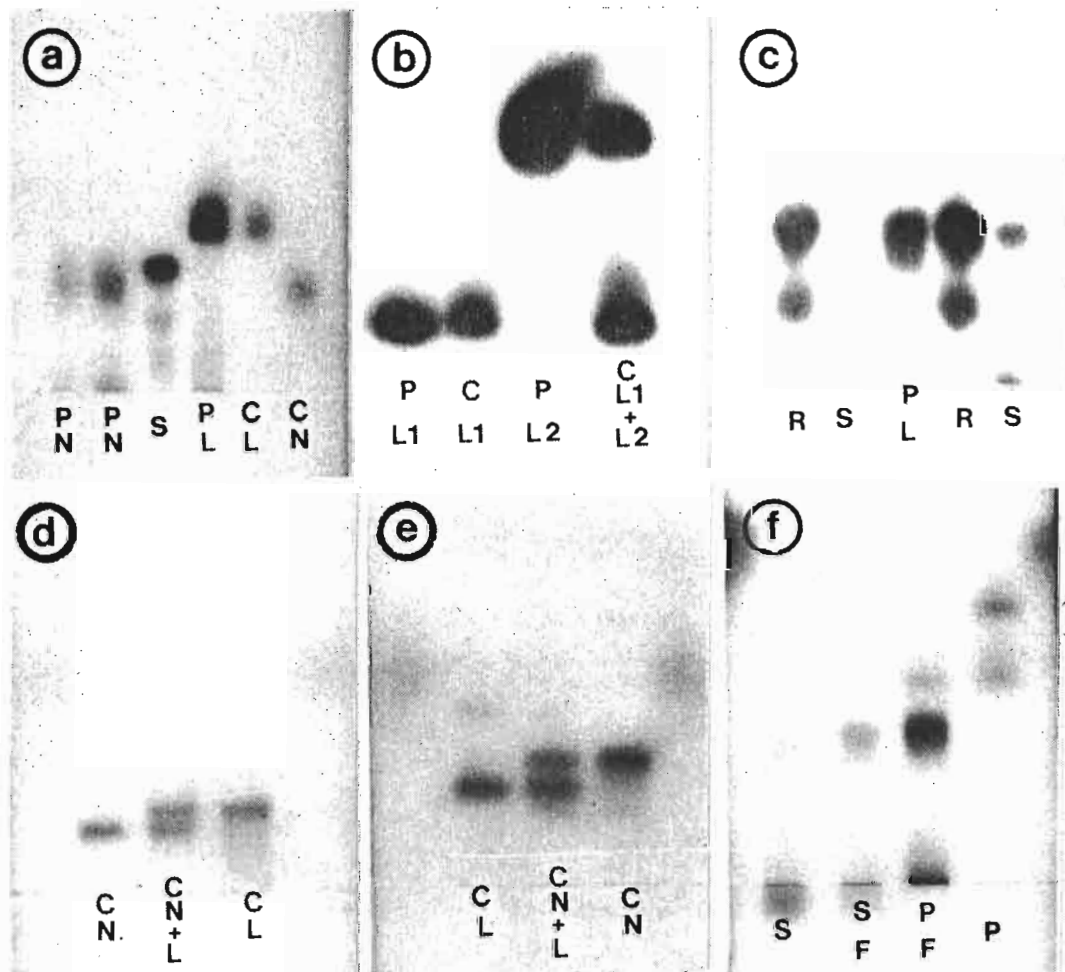
Ainsi, tout comme les autres hydrolases, les phosphatases des tissus parasites sont d'origine fongique.

2*) Activité laccase

Les résultats de l'analyse électrophorétique (diagramme Fig.8b) montrent que les tissus parasites par *R. lignosus* contiennent deux isoenzymes identiques à celles excrétées *in vitro* par le champignon.

L'hypothèse de l'origine fongique des laccases des tissus parasites est donc confirmée. Ce résultat diffère de celui obtenu par SHAIN (1971) qui conclut à l'existence de deux types de laccases; l'un présent dans les tissus réactionnels de l'Epicea infectés par *Fomes annosus*, serait synthétisé par l'arbre; le second, présent dans les tissus envahis par le parasite, serait d'origine fongique.

Figure 8 - Electrophorégrammes de différentes enzymes présentes, soit dans des extraits de tissus, soit dans des filtrats de culture; (la révélation est basée sur l'activité catalytique des enzymes).



a) phosphatase acide: S= tissus sains; PN et RL= tissus parasités par *P. noxius* et *R. lignosus*; CN et CL = filtrats de culture de *P. noxius* et *R. lignosus*. **b)** laccase: PL₁, PL₂ = laccases L₁ et L₂ purifiées à partir de tissus parasités par *R. lignosus*; CL₁+L₂ = laccase L₁ et L₂ du filtrat de culture de *R. lignosus*. **c)** peroxydase: R: tissus de réaction; S: Tissus sains; PL: tissus parasités par *R. lignosus*. **d)** phosphatase: différenciation entre les enzymes du filtrat de culture de *P. noxius* (CN) et *R. lignosus* (CL); CN + L: mélange des deux filtrats. **e)** laccase: même expérience que pour la phosphatase (d). **f)** peroxydase: pivot infecté par *P. noxius*. S tissus sains; SF: tissus sains proche du front de progression du parasite; PF: tissus parasités du front; P: tissus parasités éloignés du front.

Notons enfin que les deux laccases excrétées par *R. lignosus* sont différentes de celle produite par *P. noxius* (diagramme Fig 8e).

3°) Activité peroxydasique.

Le diagramme électrophorétique (Fig.8c) met en évidence une perturbation complexe de la biosynthèse des peroxydases dans les tissus parasités par *R. lignosus* dans lesquels apparemment, une seule des isoenzymes, originellement présentes dans les tissus sains, subsiste. Aucune isoenzyme nouvelle dont la synthèse serait éventuellement attribuable au parasite n'est révélée. Ainsi l'augmentation considérable de l'activité peroxydasique dans les tissus de type PF résulte, pour l'essentiel, de la stimulation (biosynthèse ou activité) d'une seule isoenzyme appartenant à l'hôte. Là encore l'hypothèse que nous avons proposée est vérifiée. Dans le cas des tissus réactionnels l'augmentation de l'activité peroxydasique concerne au moins deux isoenzymes.

L'étude de l'infection par *P. noxius* présente une difficulté supplémentaire du fait que le parasite excrète une peroxydase *in vitro*. La situation est donc voisine de celle qui prévaut pour d'autres enzymes ; phosphatase ou glycosidases par exemple.

Les résultats de l'électrophorèse (Fig. 8f) montrent qu'au stade PF l'activité d'une seule des isoenzymes initialement présentes dans les tissus sains est stimulée (il s'agit de cette même isoenzyme dont l'activité augmente après une attaque par *R. lignosus*). Par ailleurs deux isoperoxydases supplémentaires sont détectées dans les extraits de tissus P; elles correspondent à des enzymes excrétées par le champignon.

Nous étudierons plus en détail ces enzymes dans le cadre des réactions de l'Hévéa à l'agression parasitaire.

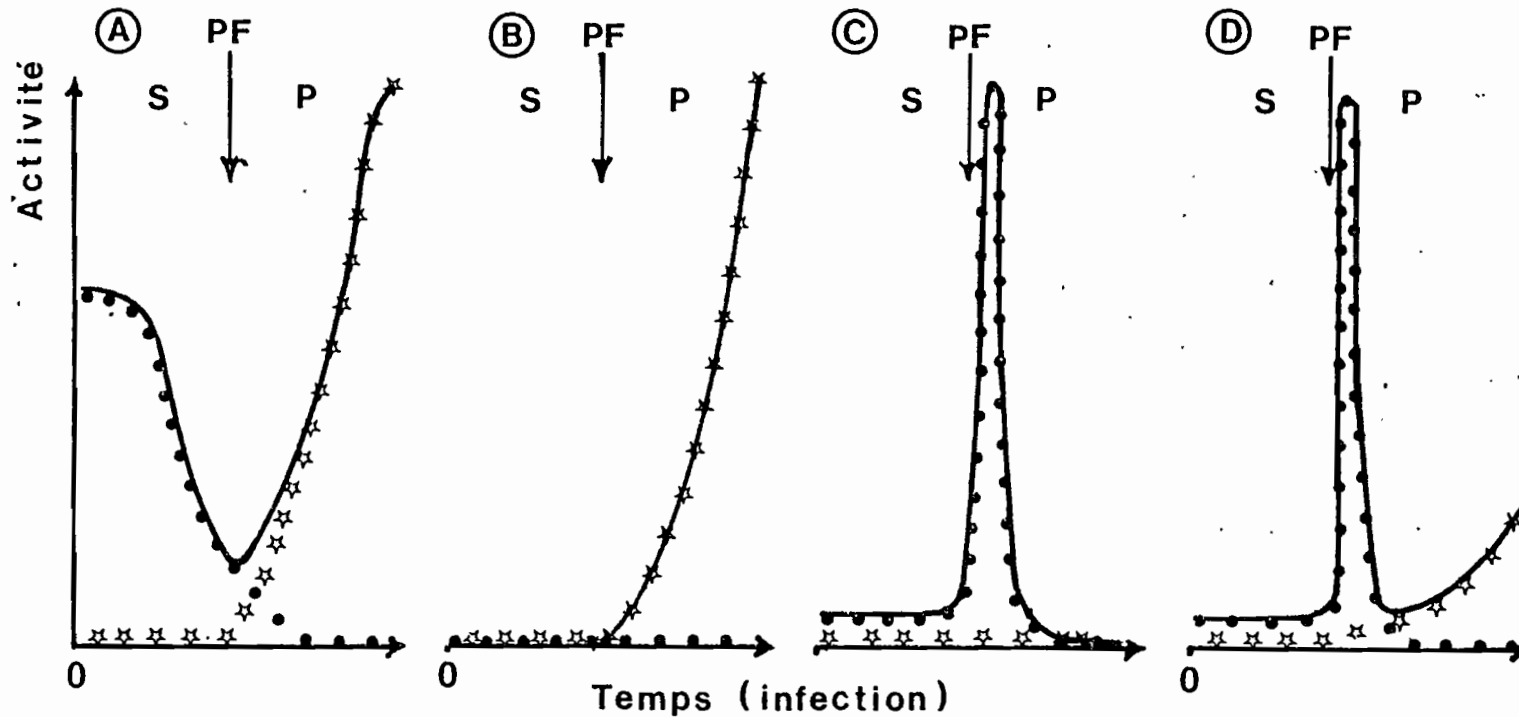
En résumé, l'analyse électrophorétique révèle que les activités phosphatase et laccase des tissus parasités sont d'origine fongique. En revanche l'activité peroxydasique de ces mêmes tissus correspond exclusivement à une réaction de l'hôte en cas d'attaque par *R. lignosus* et à un mélange d'enzymes de l'hôte et du parasite (au moins dans les premiers stades de l'attaque) en cas d'infection par *P. noxius*.

III. DISCUSSION ET CONCLUSIONS

Les résultats majeurs qui découlent des analyses enzymatiques effectuées *in vivo* sont les suivants :

- L'infection par l'un et l'autre parasite provoque dans les tissus de l'hôte une perturbation considérable de certains systèmes enzymatiques.

Figure 9 - Représentation schématique de l'évolution des activités enzymatiques dans un tissu déterminé, en fonction de la progression des parasites (évolution des tissus du stade S au stade P).



Les modèles proposés correspondent à l'évolution des activités enzymatiques suivantes:
A) phosphatase acide, b-glucosidase, a- et b-galactosidase; **B)** CM-cellulase, pectinase et laccase;
C) et **D)** peroxydase respectivement en cas d'infection par *R. lignosus* et *P. noxius*. (●—●: enzymes de l'hôte; *—*: enzymes excrétées par les parasites)

- A l'exception des peroxydases, les enzymes détectées dans les tissus parasités sont identiques à celles excrétées par les champignons *in vitro*.

- L'analyse des proportions relatives des activités enzymatiques détectées dans les tissus parasités et les milieux de culture, l'étude de la répartition spatiale de ces enzymes dans les pivots et enfin la caractérisation électrophorétique de certaines d'entre elles révèlent que **hydrolases (glycosidases et phosphatases) et laccases des tissus parasités sont d'origine fongique**. L'activité peroxydasique des tissus parasités est **dûe exclusivement à des enzymes synthétisées par l'hôte en cas d'infection par *R. lignosus* et à un mélange d'enzymes de l'hôte et du parasite en cas d'attaque par *P. noxius***.

- Les proportions relatives entre laccase et hydrolases sont **spécifiques à chacun des deux parasites (*in vivo* et *in vitro*)**.

L'ensemble de ces résultats permet de tirer les conclusions suivantes:

* Dynamique d'évolution des activités enzymatiques au sein des pivots.

Les données, en particulier celles qui résultent de l'étude de la répartition spatiale des enzymes dans le pivot, permettent de proposer un schéma général du déroulement, **dans le temps**, de l'agression des tissus lignifiés. En effet, au fur et à mesure de la progression d'un parasite dans le pivot, un tissu passe par les différents "états" suivants : Tissu sain (éloigné du front de progression du parasite) (S) ---> tissu sain proche du front (SF) ---> tissu parasité du front (PF) ---> tissu parasité éloigné du front (P)---> tissu alvéolaire (PA) (éventuellement). **Pour un tissu sain, situé dans une zone déterminée du pivot, le délai qui le séparera du stade PF dépend de son éloignement par rapport au front et de la vitesse de progression intratissulaire du parasite** qui, elle même, est sous la dépendance de multiples facteurs liés à l'agressivité du parasite et aux capacités réactionnelles de l'hôte ; **le délai nécessaire pour atteindre le stade P (ou PA) dépendra essentiellement de l'aptitude du parasite à dégrader les polymères du bois.**

D'après l'aspect des histogrammes et compte tenu de l'origine des enzymes, les différentes situations peuvent être schématisées sous la forme de quatre modèles (Fig. 9):

- Le modèle A présente l'évolution "moyenne", en fonction du temps (pré- et post-infection), de l'activité des phosphatases et des glycosidases.

- La variante B concerne les enzymes suivantes : CM-cellulase, pectinase et laccase. Elle se différencie du précédent par le fait que l'activité de ces enzymes est nulle dans les tissus sains.

-Le modèle C représente l'évolution de l'activité peroxydasique et tient

compte du fait que cette enzyme n'est synthétisée que par l'hôte.

- La variante D présente l'évolution particulière de l'activité peroxydasique qui prévaut en cas d'infection par *P. noxius* (existence de deux catégories d'enzymes, l'une synthétisée par l'hôte, l'autre par *P. noxius*).

On remarquera que pour les modèles A et D nous ayons admis la présence simultanée, dans les tissus PF, d'isoenzymes synthétisées par l'hôte et d'autres par le parasite. Une telle situation existe en effet pour la peroxydase dans les tissus attaqués par *P. noxius*. Il n'est cependant pas exclu qu'il s'agisse d'un artefact, le mode de prélèvement des tissus (au ciseau à bois) étant réellement très grossier. Seule une étude en immunocytochimie pourrait apporter des informations plus précises à ce sujet.

Ces courbes ne sont que des modèles ; le niveau d'activité des enzymes ainsi que les valeurs réelles de "t", c'est-à-dire des délais séparant le stade (S) des stades (P) ou (A) dépendent notamment, enzyme par enzyme, des capacités de synthèse des tissus sains, des aptitudes d'excrétion du parasite et des capacités réactionnelles de l'hôte.

* Excrétion, *in vitro* et *in vivo* de la laccase ; signification probable au plan taxonomique.

Si l'on considère l'excrétion de la laccase par des champignons comme témoignant de leur aptitude à dégrader la lignine (voir discussion à ce sujet chapitre II), il en découle que *P. noxius* doit être classé parmi le groupe des agents de pourriture blanche au même titre que *R. lignosus*.

* Signification de la "balance" entre activités hydrolasiques et activité laccase suivant la nature de l'agent pathogène.

D'après la nature des enzymes qu'ils excrètent, les deux champignons sont théoriquement capables de dégrader à la fois la lignine et les principaux polysides. Cependant il existe une différence considérable entre ces deux agents pathogènes au niveau des proportions entre activités hydrolasiques et activité laccase. On peut donc penser que si les activités enzymatiques qu'ils excrètent interviennent effectivement dans la dégradation des polymères pariétaux de l'hôte, alors *R. lignosus* s'attaquerait en priorité à la fraction lignine, tandis que *P. noxius* dégraderait préférentiellement la fraction polysidique. Cette différence devrait se répercuter sur le comportement parasitaire: le premier coloniserait surtout les tissus lignifiés du xylème, le second s'attaquerait de façon privilégiée aux tissus de type "cellulosique".

Ce sont ces hypothèses que nous tenterons de vérifier.

CHAPITRE II

L'AGRESSION PARASITAIRE; ROLE DES ENZYMES EXCRETEES PAR LES PARASITES

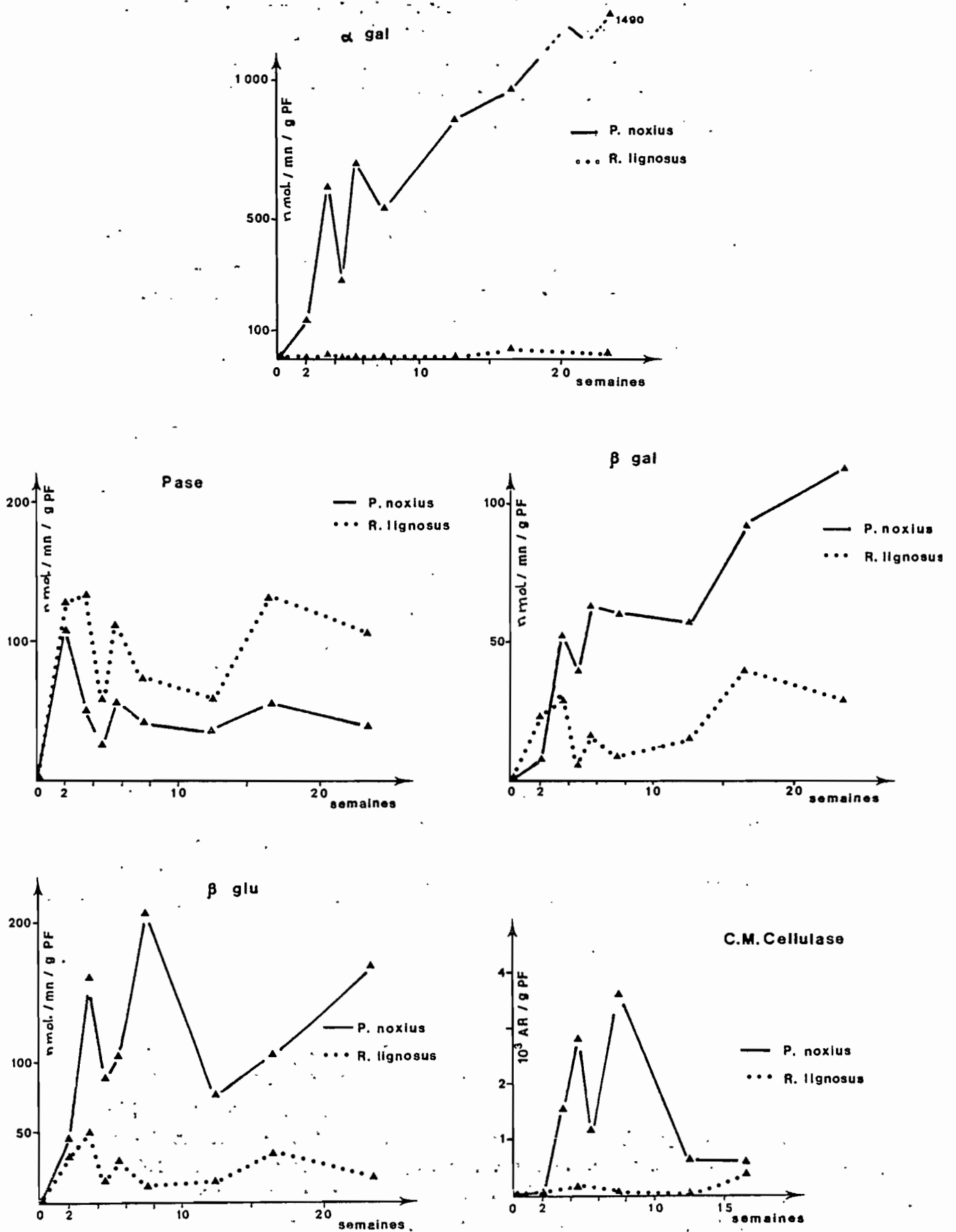
Les enzymes excrétées par les champignons, *in vivo* et *in vitro*, ne sont susceptibles d'intervenir dans le comportement parasitaire que dans la mesure où elles participent effectivement à la dégradation des tissus de l'hôte. Il était donc essentiel de vérifier l'action des enzymes recueillies dans les filtrats de culture de *R. lignosus* et de *P. noxius* sur différents polymères (lignine et polyosides) ainsi que sur le substrat naturel. Au préalable nous avons effectué une brève étude de quelques caractéristiques de l'excrétion des enzymes prises en compte. Enfin, nous avons clos cette partie des recherches par la purification partielle des enzymes excrétées par *P. noxius* afin de mettre en évidence la diversité de l'équipement enzymatique de ce parasite.

I. MODALITES DE L'EXCRETION DES ENZYMES

1. EXCRETION EN FONCTION DU TEMPS.

Cette étude a été réalisée en cultivant les deux champignons sur des bûchettes de bois découpées dans des racines d'Hévéa. Cette technique de culture présentait l'intérêt de confronter les champignons à un substrat qui du point de vue de la composition des polymères de structure est identique à celui qu'ils rencontrent dans la nature (dans ce dernier cas il s'agit cependant d'un tissu vivant, capable de réaction, et non d'un substrat inerte). L'utilisation d'un substrat non altéré doit conduire à une induction des différentes enzymes dans des conditions voisines de celles qui prévalent dans la nature (ALBERSHEIM et ANDERSON-PRONTY, 1972 ; TOUZE, 1972). Dans notre cas, la mise en oeuvre de bûchettes simplement stérilisées, permettait en principe de conserver intact l'équilibre préexistant entre polymères et oligomères, ces derniers jouant un rôle fondamental dans l'induction des enzymes extracellulaires (Mac MILLAN et VAUGHN, 1964). Enfin ce type de substrat autorisait le maintien de cultures actives durant des périodes de plusieurs mois (ce qui n'est guère possible sur un milieu liquide) et, par conséquent, l'étude de la variation des activités enzymatiques dans un substrat en constante évolution, du fait même des enzymes excrétées par les champignons.

Figure 10 A - Evolution de quelques activités enzymatiques au sein de bûchettes infectées par *R. lignosus* et *P. noxius*.



Les résultats (Fig. 10 A et B) révèlent une évolution en "dents de scie" des activités enzymatiques ; nous pensons que cette évolution n'a pas de signification physiologique réelle, mais qu'en fait elle témoigne plutôt d'une hétérogénéité au niveau des cultures, surtout durant les premières semaines de croissance. De telles variations sont souvent enregistrées au cours de ce type d'expérimentation. Les résultats majeurs sont les suivants:

a) De manière très générale **nous retrouvons les caractères distinctifs fondamentaux des deux champignons, en matière d'excrétion enzymatique : prédominance des activités hydrolytiques chez *P. noxius*, de l'activité laccase (et catalase) chez *R. lignosus*.**

b) De même l'activité α -galactosidase en tant que caractère discriminatoire est confirmé, encore que *R. lignosus* n'en soit pas totalement dépourvu.

c) L'évolution de l'activité laccase sécrétée par *R. lignosus* est remarquable : alors que la production de cette enzyme est très active en début de culture, elle chute brutalement après une période de deux mois pour se maintenir ensuite à un niveau faible. Ce résultat est en accord avec celui enregistré *in vivo*. Nous avons, en effet, observé que l'activité laccase est maximale au niveau du front de progression du parasite et diminue assez rapidement au fur et à mesure que l'on s'éloigne de ce front vers les tissus les plus anciennement colonisés. Une telle évolution suggère l'intervention d'un système particulier de régulation de la synthèse de cette enzyme ou une inhibition de son activité par des composés, déchets du métabolisme du champignon ou produits de dégradation du bois, qui s'accumulent dans ce milieu. On ne peut y déceler l'effet d'une éventuelle réaction de l'hôte, ces variations étant enregistrés *in vitro* ou *in vivo* et dans ce dernier cas dans des tissus nécrosés.

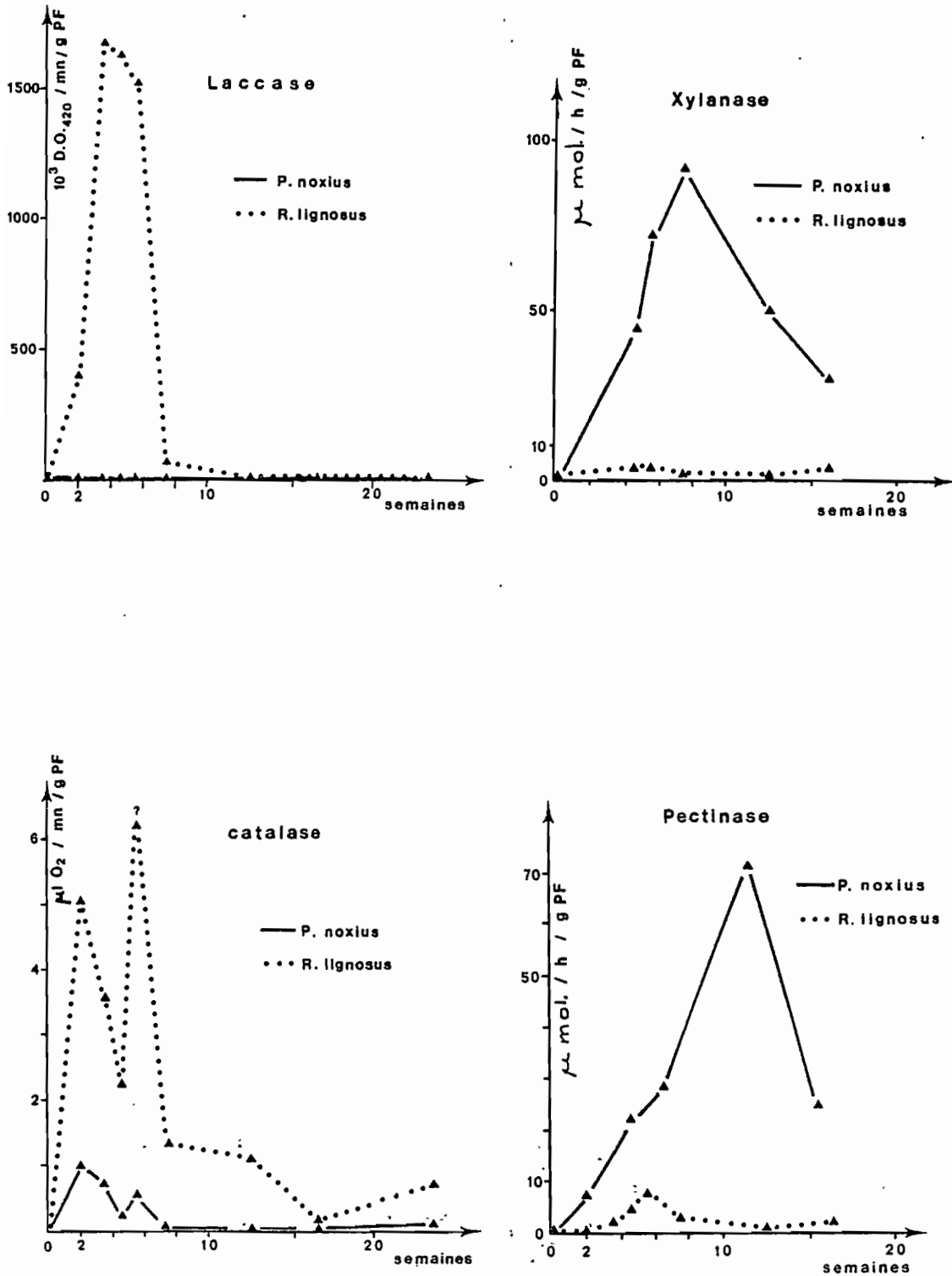
Concernant *P. noxius*, l'activité laccase demeure faible durant toute la durée de l'expérience. Une étude plus récente révèle cependant qu'elle est plus forte après trois qu'après seulement un mois de culture démontrant ainsi une tendance inverse de celle présentée par *R. lignosus*.

d) L'activité catalase

Des essais préliminaires avaient révélé l'excrétion d'une catalase par l'un et l'autre champignon, tant *in vitro* qu'*in vivo*. La présente étude montre que ces enzymes sont excrétées très activement par *R. lignosus*, beaucoup plus modérément par *P. noxius*. Dans les deux cas la catalase s'accumule surtout en début de culture. Son activité diminue progressivement en fonction de l'âge des cultures sans toutefois devenir négligeable, au moins chez *R. lignosus*.

Nous avons porté un intérêt à cette activité enzymatique parce qu'elle est susceptible d'entrer en compétition avec celle des peroxydases, notamment de

Figure 10 B - Evolution de quelques activités enzymatiques au sein de bûchettes infectées par *R. lignosus* et *P. noxius*



l'hôte (au niveau du front de progression du parasite ou de l'interface SF-->PF), elle même probablement essentielle dans l'étape finale de la biosynthèse de la lignine. Par ailleurs l'oxygène moléculaire, libéré sous l'action des catalases sur l'eau oxygénée, constitue l'un des substrats de la laccase, permet à cette enzyme d'exercer son activité catalytique.

Ainsi, au plan théorique, la catalase favoriserait plutôt les réactions de dégradation tissulaire au détriment des réactions de défense de l'hôte ; à condition toutefois qu'il n'existe pas une compartimentation étroite et différente pour ces trois enzymes.

e) L'activité xylanase

Les xylanases font partie du groupe des hémicellulases. L'évolution de l'activité xylanase en fonction du temps de culture sur bûchettes est similaire à celle des autres polyosidases. De même ces enzymes sont excrétées plus activement par *P. noxius* que par *R. lignosus*.

En définitive, si l'on considère les résultats concernant les différentes activités enzymatiques testées dans leur ensemble, il apparaît qu'il existe une très bonne cohérence entre les données enregistrées respectivement *in vivo* et *in vitro* (milieu liquide ou solide).

2. ESTIMATION DU TAUX D'EXCRETION DE QUELQUES ENZYMES

Les activités enzymatiques, que nous avons quantifiées à différentes reprises et dans diverses conditions, correspondent à celles de protéines solubles puisque dosées dans des filtrats de culture ou des extraits de tissus obtenus après broyage dans un milieu tamponné de faible force ionique. Pour les raisons que nous avons déjà indiquées nous avons considéré ces enzymes solubles comme jouant un rôle privilégié dans le processus de dégradation tissulaire. Il était néanmoins intéressant de vérifier quelle fraction de ces enzymes, synthétisées par les champignons, était réellement excrétée.

Quatre classes d'enzymes ont été prises en compte pour cette estimation:

* Enzymes extracellulaires

- solubles (filtrat et "rinçage" du mycélium)
- liées ioniquement (solubilisées par une solution de NaCl 0,75 M)

* Enzymes intracellulaires

- solubles (extraites par broyage du mycélium dans un tampon phosphate de sodium 0,0125 M à pH 6)
- liées ioniquement (solubilisées par macération du résidu de broyage dans une solution de NaCl 0,75 M).

Tableau : 4

Répartition des activités enzymatiques
(pourcentage de l'activité totale)

A. *P. noxius*

Enzymes et milieux	Extracellulaire (E)		Intracellulaire (I)		E	I	
	Soluble	Liée	Soluble	Liée			
P5	Liq.	11	13,6	38,2	37,2	24,6	75,4
	Sci.	28,7	9,1	51	14,2	37,8	62,2
β-glu	Liq.	62,1	11,1	12,3	14,5	73,2	26,8
	Sci.	28,4	15,5	39,3	16,8	43,9	56,1
α-gal	Liq.	17,3	19,1	30,7	32,9	36,4	63,6
	Sci.	34,3	19,5	37	9,2	53,8	46,2
β-gal	Liq.	60,1	10,5	13,9	15,5	70,6	29,4
	Sci.	55,9	11,6	24,7	7,8	67,5	32,5
Lac	Liq.	95,5	2,1	1,0	1,4	97,6	2,4
	Sci.	92,2	4,4	2,4	1,0	96,6	3,4
Perox	Liq.	92,6	6,4	0,8	0,2	99,0	1,0
	Sci.	89,7	3,9	6,0	0,4	93,6	6,4
Cat.	Liq.	65,3	9,5	22,5	2,7	74,8	25,2
	Sci.	3,4	8,1	82,6	5,9	11,5	88,5

B. *R. lignosus*

P5	Liq.	14,9	9,7	26	49,4	24,6	75,4
	Sci.	11,8	12,7	57,2	18,3	24,5	75,5
β-glu	Liq.	44,6	18,6	7,7	29,1	63,2	36,8
	Sci.	33	26,6	22,2	18,2	59,6	40,4
β-gal	Liq.	12,8	14,2	15,3	57,7	27,0	73
	Sci.	23,7	21,8	31,0	23,5	45,5	54,5
Lac	Liq.	95,6	3,6	0,3	0,5	99,2	0,8
	Sci.	94,1	4,7	0,9	0,3	98,8	1,2
Cat.	Liq.	3,3	6,1	65,2	25,4	9,4	90,6
	Sci.	33,7	1,5	59,8	5	35,2	64,8

Liq. : milieu bouillon de sciure d'Hévée

Sci. : milieu sciure d'Hévée

Les résultats (Tableau 4) révèlent des situations très variables qui dépendent de la nature des enzymes et, pour certaines d'entre elles, de la nature du milieu de culture. Parmi les enzymes les moins activement excrétées on peut citer les phosphatases (*R. lignosus* et *P. noxius*), a-galactosidases (*P. noxius*) et b-galactosidases (*R. lignosus*). Toutes les autres sont relarguées dans le milieu de culture à près, ou plus, de 50 % par rapport à leur activité totale. Une remarque particulière concerne la laccase excrétée à 90-95 % par chacun des champignons, et la catalase dont l'excrétion est très fortement liée à la nature du milieu de culture et, pour un milieu déterminé, à la nature du champignon.

Cet essai a été réalisé sur des cultures (31 à 35 pour chaque motif) âgées de 13 jours. Il représente donc un instantané d'une situation qui peut être en perpétuelle évolution. Une telle évolution existe au moins pour l'a-galactosidase qui, en début de culture est surtout intracellulaire. Le taux d'excrétion augmente progressivement avec l'âge de la culture sans que l'on puisse, *a priori*, en rendre responsable une éventuelle lyse mycélienne.

Au cours de cette expérimentation, et pour chaque type d'enzyme, nous avons classé les activités en quatre groupes, suivant les critères définis plus haut. Dès lors on pouvait se demander si pour chaque groupe et pour chaque type d'enzyme l'activité était imputable aux mêmes protéines enzymatiques ou à des isoenzymes différentes.

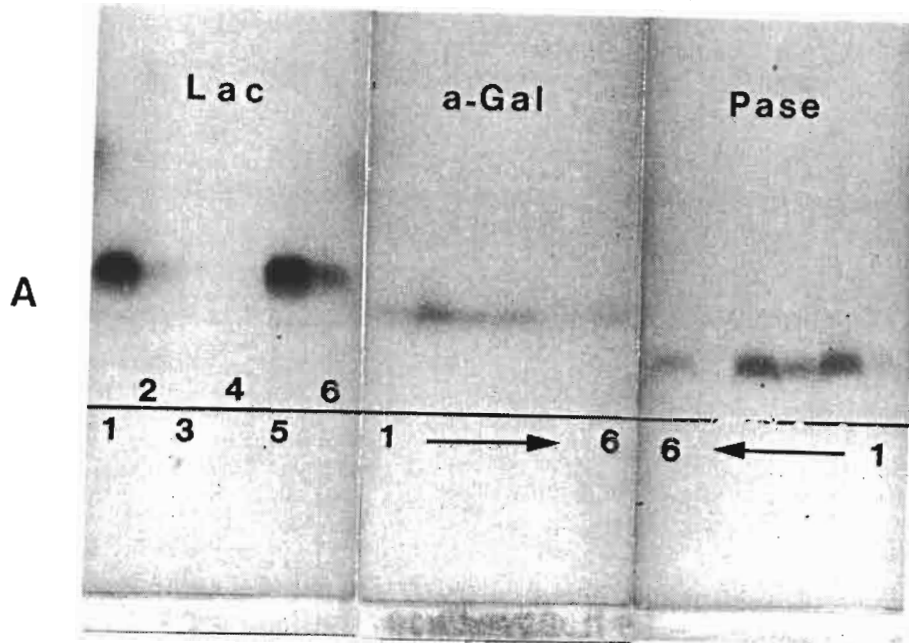
L'analyse électrophorétique (Fig. 11) réalisée pour cinq activités enzymatiques différentes (phosphatase, b-glucosidase, a- et b-galactosidase et laccase) révèle que si plusieurs isoenzymes peuvent contribuer à une activité catalytique donnée, par contre il n'existe aucune différence de composition isozymique entre les fractions extra- et intracellulaire. Ainsi, pour les activités étudiées, les mêmes enzymes ou isoenzymes sont à la fois intra et extracellulaires, il n'existe aucune spécialisation dans l'excrétion des enzymes à ce niveau, seules les proportions des activités totales varient.

Tous les champignons ne possèdent pas de telles caractéristiques. Ainsi, chez *Fomes annosus*, *Rhizoctonia solani* ou *Trametes* par exemple, on observe des différences de composition isozymique entre les équipements intra- et extracellulaires et une évolution qualitative (et quantitative) en fonction du temps de culture (HAARS et al., 1981 ; HUTTERMANN et al., 1979 ; ZUBER et MANIBHUSHANRAO, 1982 ; SCHANEL et al., 1971).

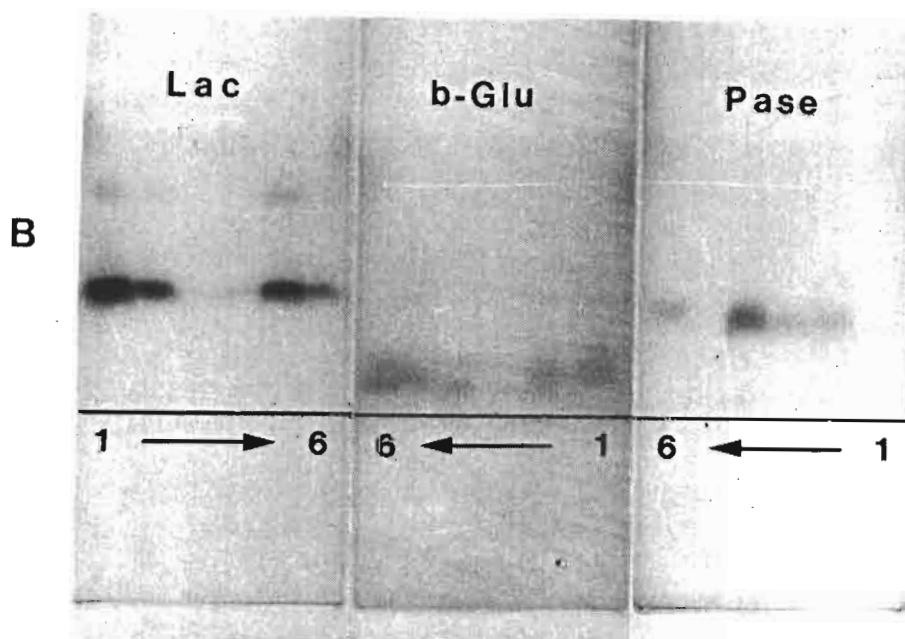
3. INDUCTIBILITE DES ENZYMES EXTRACELLULAIRES

De très nombreux travaux ont été réalisés par le passé sur la régulation de la synthèse des enzymes extracellulaires. Il est apparu que la majorité d'entre elles se classent dans la catégorie des enzymes inductibles. Il en est ainsi, à

Figure 11 - Comparaison par électrophorèse en gel d'amidon des isoenzymes extra- et intra-cellulaires; **A)** et **B)**: enzymes provenant respectivement de cultures de *P. noxius* et *R. lignosus*. (Les enzymes sont révélées par leur activité catalytique).



1: filtrat de culture (bouillon de sciure d'Hévée); 2: lavage du mycélium par du tampon contenant du NaCl 0,75M; 3: extrait mycélien; 4: lavage du broyat mycélien par le tampon précédent; 5 et 6: comme 1 et 2 mais sur une culture sur sciure d'Hévée.



titre d'exemple, des systèmes pectinolytiques et cellulolytiques de *Macrophomina phaseolina* (MADKOUR et ALY, 1981), de la cellulase de *Sporotrichum thermophile* (CANEVASCINI et al., 1978) et de *Chrysosporium lignorum* (= *Sporotrichum pulverulentum* = *Phanerochaete chrysosporium*) (ERIKSSON et RZEDOWSKI, 1969a) ou d'*Acetivibrio* (SADDLER et KHAN, 1980) ou encore de la laccase de *Fomes annosus* (HAARS et al., 1981; HAARS et HÜTTERMANN, 1983).

Concernant les enzymes excrétées par *R. lignosus* et *P. noxius*, le tri entre ces deux classes a été réalisé en cultivant les deux champignons sur les trois milieux suivants :

- milieu minéral + glucose (20 g/l) (révélation des enzymes constitutives)
- milieu "sciure d'Hévéa", qui devrait contenir un large spectre d'inducteurs
- milieu "papier filtre" (= milieu minéral + 25 g de papier filtre/l) dont le pouvoir inducteur, s'il existe, devrait se limiter au système cellulolytique.

Chacun de ces trois milieux permet une bonne croissance des deux champignons (bien qu'elle ne puisse être quantifiée, dans les deux dernières conditions de culture).

Les résultats sont particulièrement significatifs: **sur les neuf activités enzymatiques extracellulaires, testées chez *P. noxius* (Fig. A et B), seule la peroxydase est constitutive. Dans le cas de *R. lignosus* (Fig. 12 C), trois types d'enzymes présentent une faible activité sur milieu minéral glucosé : phosphatase, b-glucosidase et a-galactosidase; les autres sont adaptatifs.**

Le milieu "papier filtre" constitue un bon inducteur du système cellulolytique : CM-cellulase et b-glucosidase, aussi bien chez *P. noxius* que chez *R. lignosus* (induction particulièrement efficace de la cellulase habituellement très peu active, même sur milieu sciure); il est cependant surprenant de constater l'induction de la biosynthèse d'autres systèmes enzymatiques par ce milieu (a- et b-galactosidases et xylanase chez *P. noxius*, phosphatase, b-galactosidase et laccase chez *R. lignosus*).

Ces résultats conduisent à deux hypothèses:

- ou la biosynthèse des différentes enzymes se trouve sous la dépendance d'un même système de régulation (ou il existe une induction "en cascade" des différentes enzymes),
- ou bien le papier filtre n'est pas constitué de cellulose pure, mais contient des inducteurs adéquats des systèmes enzymatiques ne faisant pas partie du complexe cellulolytique.

Figure 12 A - Induction des enzymes extracellulaires de *P. noxius* (symboles: voir Fig 12 B).

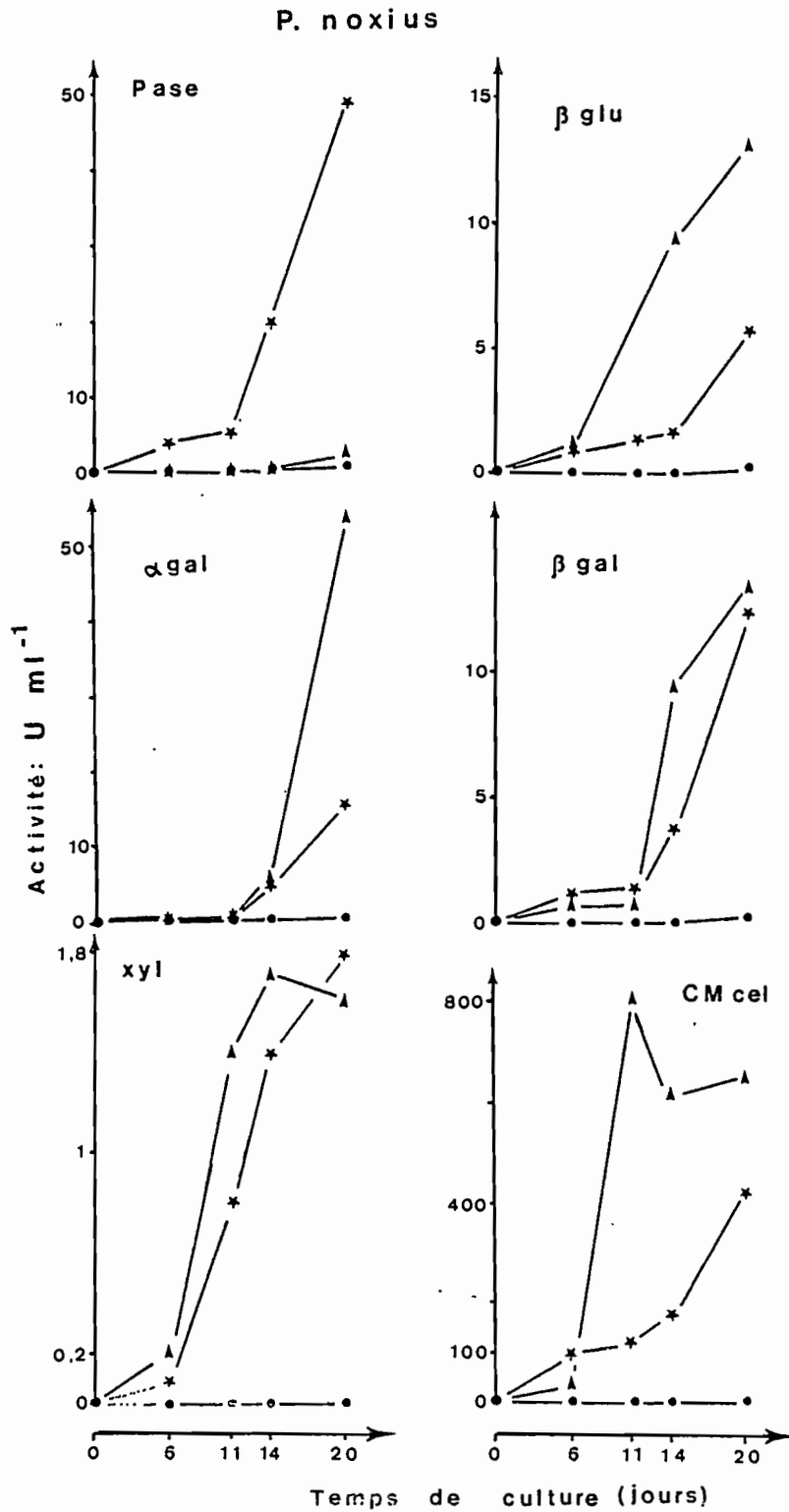


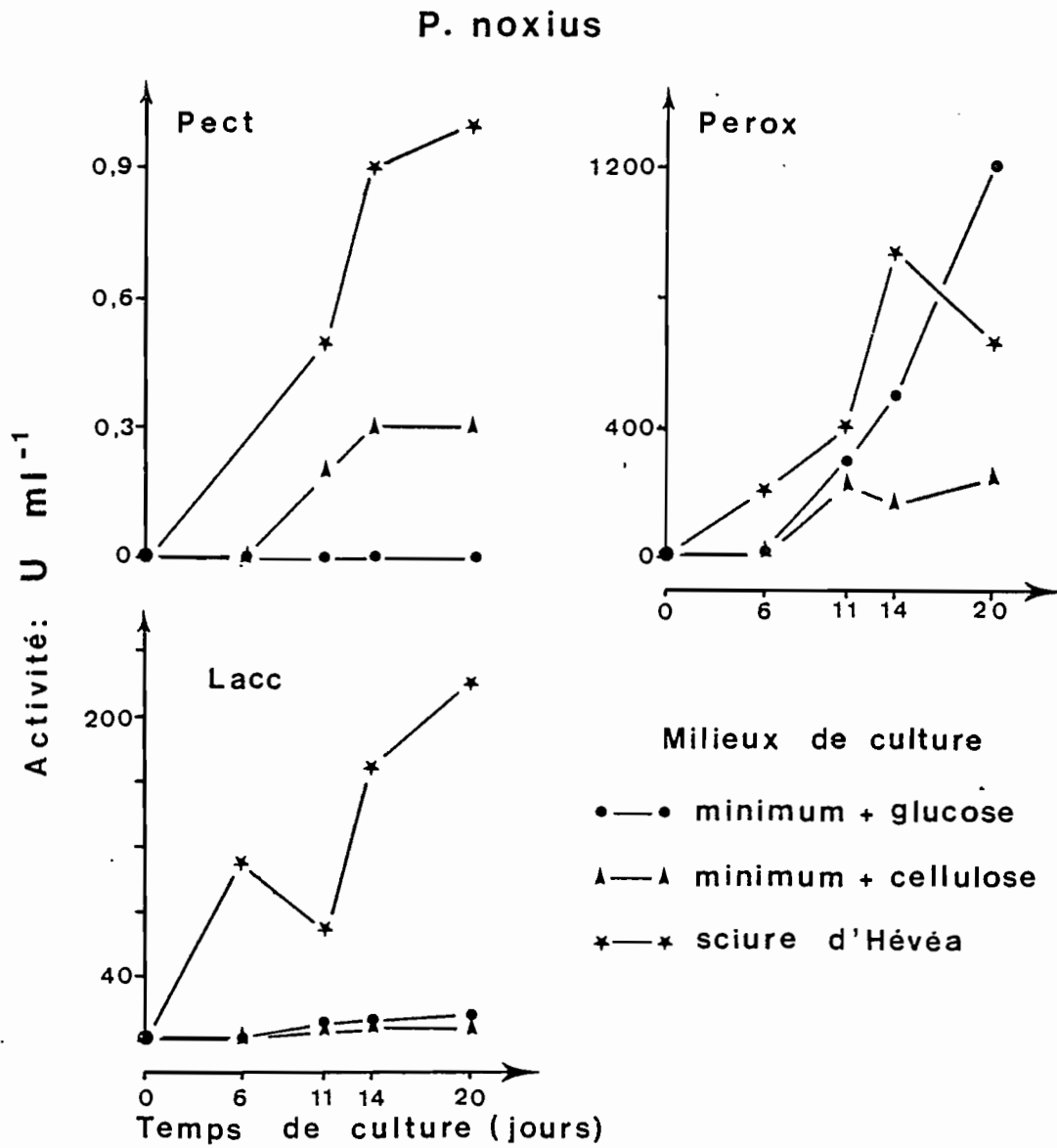
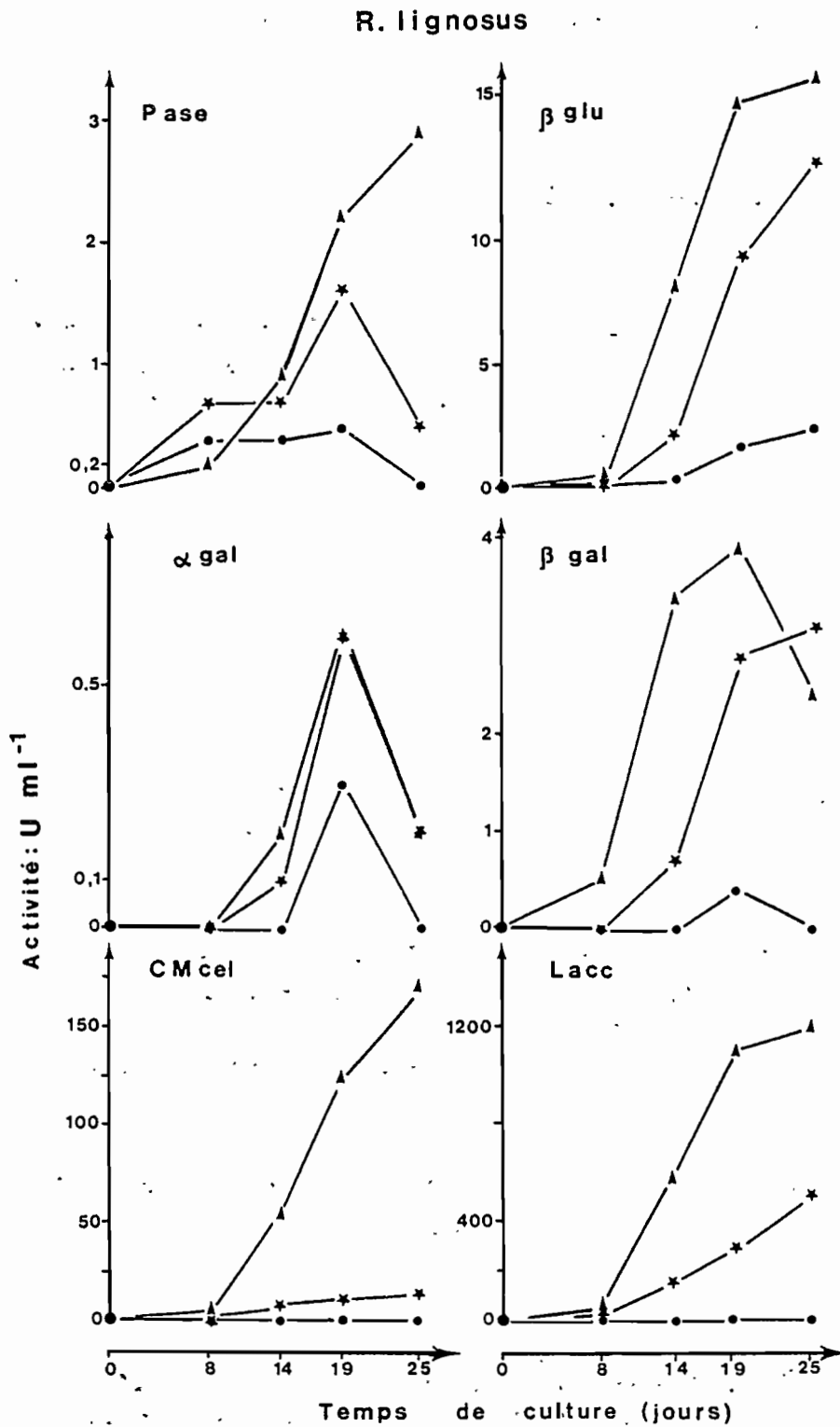
Figure 12 B - Induction des enzymes extracellulaires de *P. noxius*.

Figure 12 C - Induction des enzymes extracellulaires de *R. lignosus* (symboles: voir Fig 12 B).



D'après les travaux d'autres auteurs, l'une et l'autre de ces hypothèses peuvent être légitimes. En effet, d'une part ERIKSSON (1981 a) a montré que la biosynthèse de l'endo-glucanase est induite par le cellobiose à une concentration de 1mg par litre; d'autre part ERIKSSON et GOODELL (1974) ont pu déterminer que chez *S. pulvérulentum* la production à la fois d'une endo-xylanase et des endo-glucanases était induite par le xylane purifié comme seule source carbonée. Ces auteurs estiment que la biosynthèse de ces enzymes est sous la dépendance d'un même gène régulateur.

II. LA DEGRADATION DES POLYOSIDES

L'objectif principal de cette partie de l'étude est de répondre à la question suivante : les enzymes excrétées par *R. lignosus* et *P. noxius* sont-elles réellement capables de dégrader les polyosides pariétaux ?

Dans un second temps nous avons tenté de préciser la nature des complexes enzymatiques intervenant respectivement dans la cellulolyse et la pectinolyse.

Enfin dans un troisième temps nous avons réalisé une purification partielle des hydrolases excrétées par *P. noxius* afin de comparer son équipement enzymatique à celui d'autres agents de pourriture du bois.

1. ACTION DES FILTRATS DE CULTURE DE *R. LIGNOSUS* ET *P. NOXIUS* SUR LA SCIURE DE BOIS D'HEVEA.

Afin de vérifier la capacité des enzymes, excrétées par les deux champignons, à dégrader les polyosides pariétaux nous avons fait agir des filtrats de culture sur le substrat naturel constitué par de la sciure débarrassée des "extractibles". Une partie aliquote du milieu réactionnel est prélevée à divers intervalles de temps et la dégradation est appréciée de deux manières :

- dosage quantitatif des sucres réducteurs libérés à partir du polymère,
- chromatographie sur gel de silice dans des conditions permettant de séparer les oses simples et certains oligosides.

a) Estimation quantitative

La figure 13 présente une cinétique de la dégradation des polyosides de la sciure de bois d'Hévéa, par des filtrats de culture de *R. lignosus* et *P. noxius*. Elle démontre que les enzymes excrétées par ces champignons sont effectivement capables de réaliser une telle dégradation.

Dans les conditions expérimentales utilisées le filtrat de culture de *P.*

Figure 13 - Dégradation des polysides de la sciure par un filtrat de culture concentré de *R. lignosus* et *P. noxius* (Pour les activités enzymatiques de ces milieux: voir Tabl. 5).

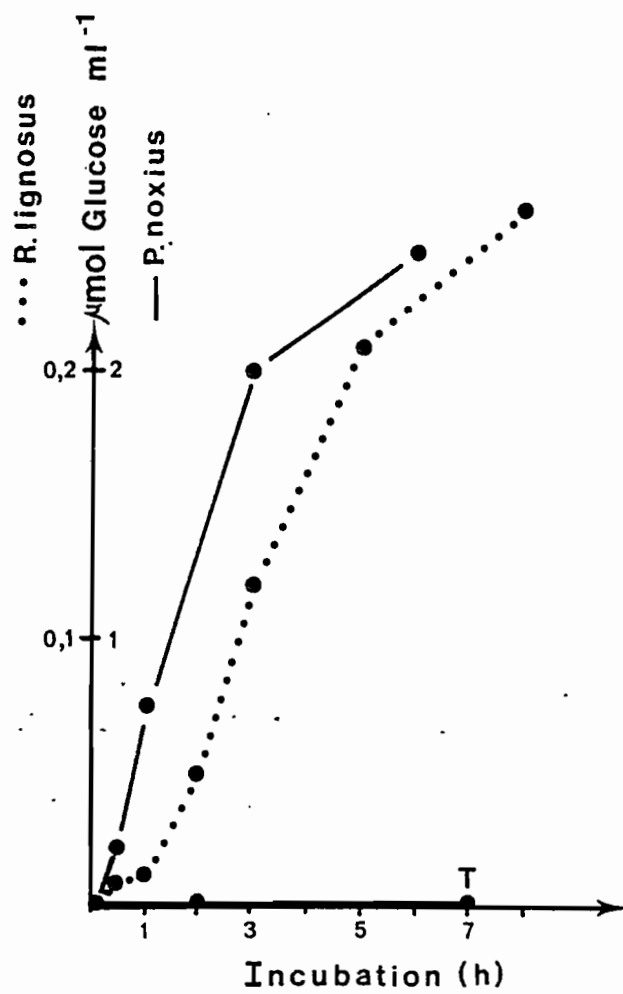


Tableau 5

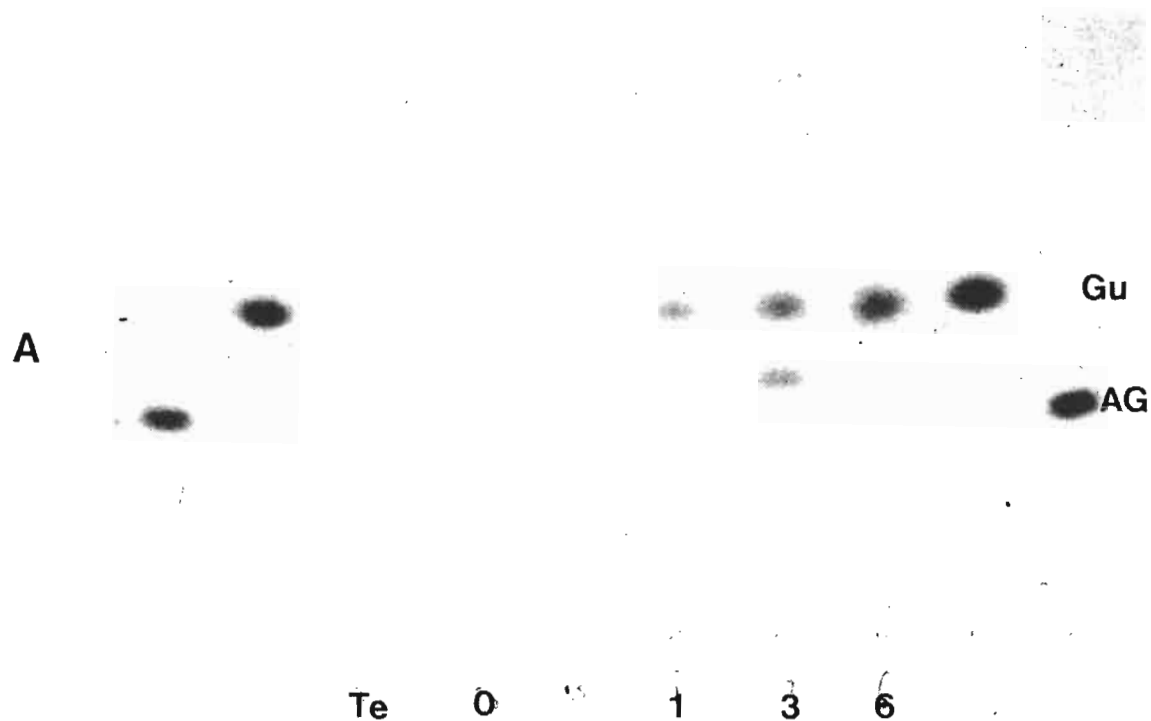
Activités enzymatiques (U/ml) présentes dans les milieux réactionnels mis en oeuvre au cours des essais de dégradation de la sciure de bois par des filtrats de culture de *P. noxius* (PN) et *R. lignosus* (RL).

Activités enzymatiques	Milieux réactionnels comportant un filtrat de		RL/PN
	<i>P. noxius</i> (PN)	<i>R. lignosus</i> (RL)	
Phosphatase	7,9	-	-
b-glucosidase	0,8	40,7	51
a-galactosidase	2,4	0,6	0,25
b-galactosidase	1,1	8,8	8
Pectinase	0,6	0,04	0,02
Xylanase	-	0,3	-
Laminarinase		0,28	-
CM-cellulase	65	74	1,1

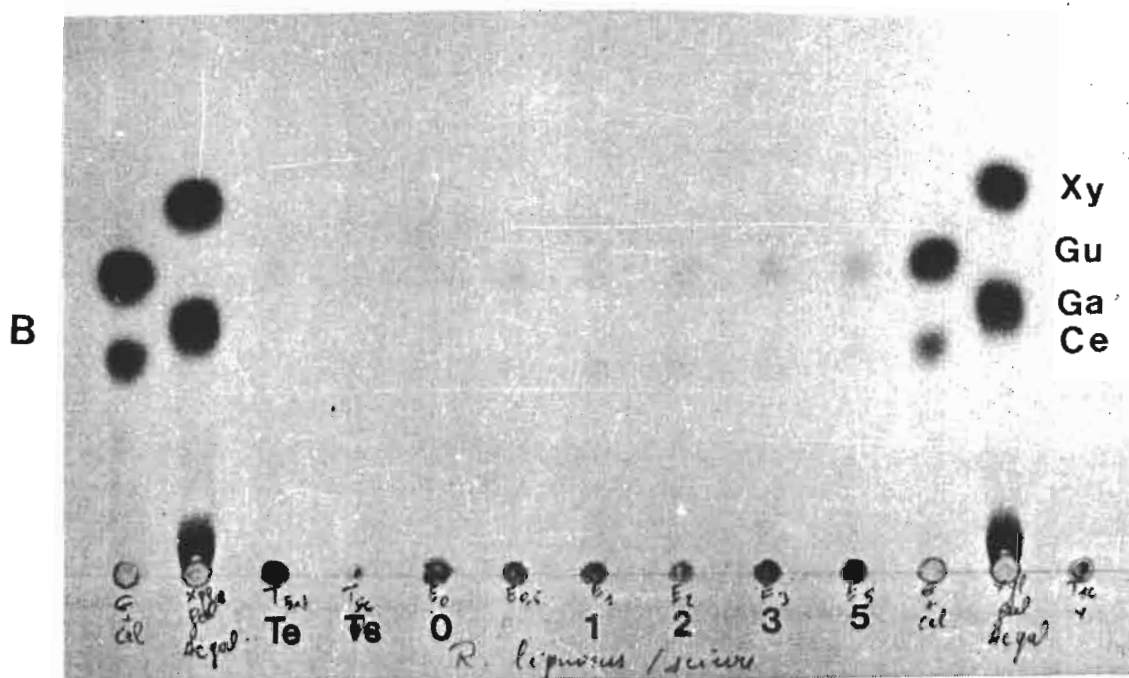
Les filtrats proviennent de cultures effectuées dans des conditions et sur des milieux différents. Le rapport RL/PN n'a donc ici aucune signification physiologique; il indique simplement les proportions relatives des activités enzymatiques mises en oeuvre au cours des présents essais.

Figure 14 - Dégradation enzymatique de la sciure: séparation par CCM de gel de silice des sucres contenus dans les milieux réactionnels suivants:

A) sciure + filtrat de culture de *P. noxius*, système de migration butanol-acide acétique - eau.



B) sciure + filtrat de culture de *R. lignosus*, système de migration: propanol-eau.



Temps d'incubation variable (0 à 6 heures). Composition du milieu réactionnel: sciure à 1% en suspension dans du tampon citrate 0,01M, pH 4,6. Composition enzymatique du milieu réactionnel: voir tableau 5. AG: acide galacturonique; CE: cellobiose; GA: galactose; GU: glucose; XY: xylose; Te: témoin filtrat de culture; Ts: témoin sciure.

noxius est environ 10 fois plus actif sur la sciure que celui de *R. lignosus*. Cette différence ne peut être expliquée par l'activité CM-cellulase présente dans les milieux réactionnels (Tableau 5) (elle est équivalente dans les deux milieux), ni par l'activité b-glucosidase (50 fois plus élevée dans le milieu comportant les enzymes de *R. lignosus* que dans celui comportant le filtrat de culture de *P. noxius*). Nous pensons qu'une (ou plusieurs) enzyme(s), autre(s) que celles que nous venons de citer, doivent intervenir dans la dégradation de la sciure (nous verrons plus loin que cette activité enzymatique pourrait être de type "avicelase").

b) Estimation qualitative.

Les deux chromatogrammes de la figure 14 A et B révèlent que l'activité enzymatique des filtrats de culture a pour effet de libérer divers monomères et oligomères. Deux sucres ont pu être identifiés avec certitude : le glucose et le cellobiose. Les taches situées entre celle du cellobiose et le point de dépôt de l'échantillon correspondent à des oligomères de degré de polymérisation supérieur à 2. Elles témoignent sans ambiguïté de l'intervention d'enzymes agissant selon le mode "endo" (provoquant la scission de la macromolécule au "hasard" le long de la chaîne d'unités glucose).

Au plan quantitatif on retrouve la différence d'activité entre le filtrat de culture de *R. lignosus* et celui de *P. noxius*. L'accumulation de glucose, produit ultime de la dégradation de la cellulose peut résulter soit de l'activité d'une enzyme de type "exo" (scission du polymère à partir de l'extrémité non réductrice), soit de l'hydrolyse du cellobiose ou des oligosides en glucose par l'intermédiaire d'une b-glucosidase. Il est à noter que l'absence quasi totale de cellobiose sur le chromatogramme du milieu réactionnel contenant le filtrat de *R. lignosus* est sans doute à attribuer à sa très importante activité b-glucosidase hydrolysant immédiatement en glucose le cellobiose (et les cellodextrines à courte chaîne) libéré à partir du polymère.

En cas d'incubation de longue durée et en présence d'un filtrat de culture de *P. noxius* fortement concentré, de l'acide galacturonique est libéré à partir de la sciure de bois, témoignant de l'intervention d'enzymes pectinolytiques. Dans des conditions expérimentales similaires, le filtrat de culture de *R. lignosus* s'avère beaucoup moins efficace: seules des traces d'acide galacturonique sont décelables après chromatographie sur gel de silice; ce résultat est à mettre en relation avec la très faible activité pectinolytique excrétée par ce champignon.

Enfin, même après 24 heures d'incubation, nous n'avons pas réussi à mettre du xylose en évidence dans les milieux réactionnels. Ceci tendrait à prouver soit que la xylanase dont l'activité apparaît loin d'être négligeable, n'est pas efficace sur la sciure de bois, soit que le système xylanasique ne comporte qu'une (ou des) enzyme(s) de type "endo" à l'exclusion de toute activité xylosidase. Une telle situation prévaut dans le cas de filtrats de culture de *Colletotrichum lindemuthianum* (DOUX-GAYAT et al. 1978).

2. LE COMPLEXE CELLULOLYTIQUE DE *R. LIGNOSUS* ET *P. NOXIUS*.

Nous venons de voir que la cinétique de libération d'oses réducteurs à partir de sciure de bois ne pouvait être expliquée entièrement par l'activité des enzymes répertoriées dans les filtrats de culture. Il fallait admettre l'existence, dans ces filtrats, d'une (ou plusieurs) enzyme(s) supplémentaire(s) responsables de la différence d'activité dépolymérisante constatée.

D'après le schéma de dégradation enzymatique de la cellulose proposé par GHOSE et al. (1981) (Fig. 15), trois enzymes sont nécessaires à l'hydrolyse totale du polymère en son monomère constitutif, le glucose :

- l'exoglucanase ou 1,4 b-glucane cellobiose hydrolase (EC 3.2. 1,91), (=) seule enzyme capable d'attaquer la cellulose cristalline, par hydrolyse des liaisons b-(1-->4). Cette hydrolyse s'effectue à partir de l'extrémité non réductrice et libère du cellobiose.

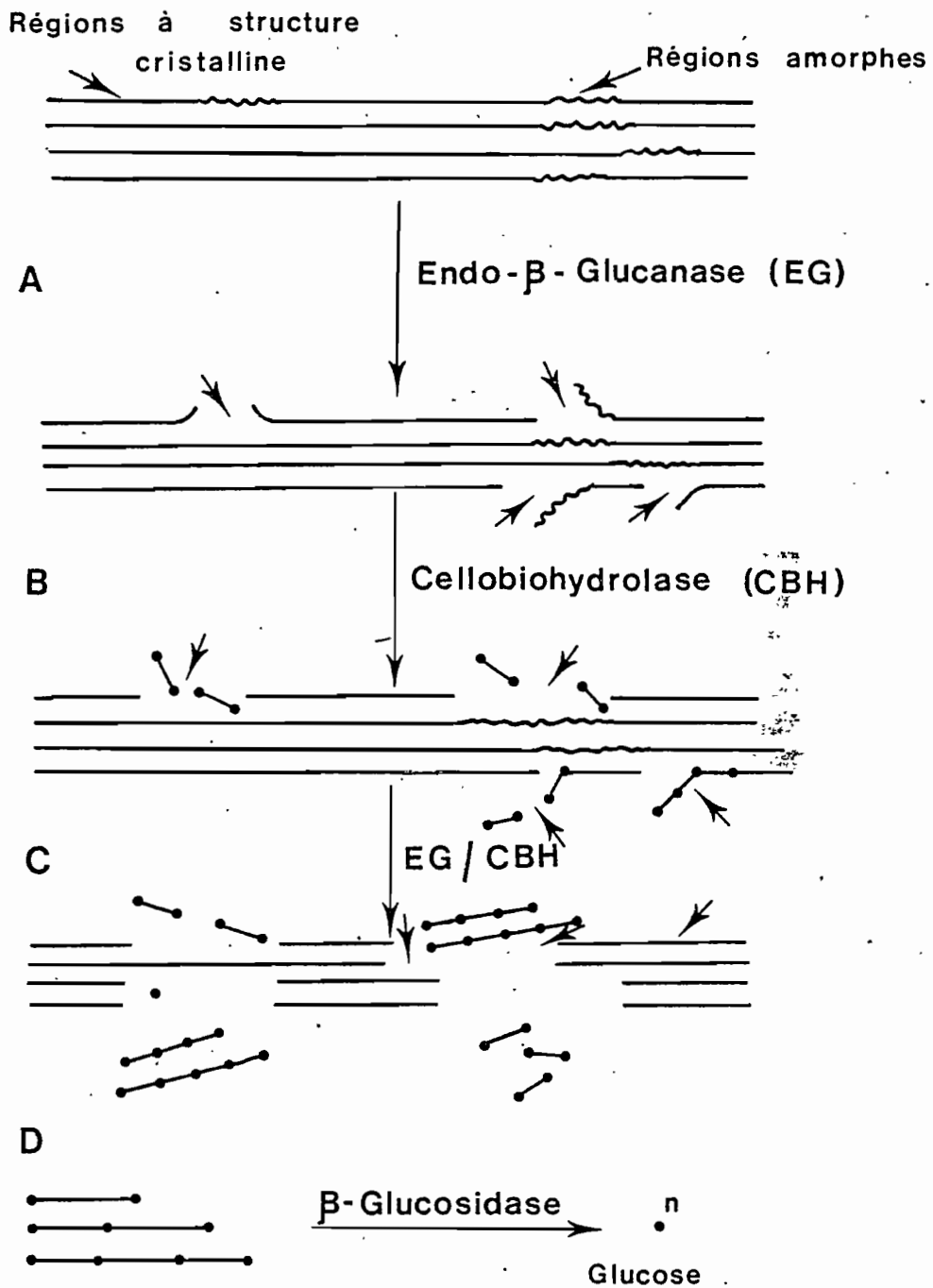
En fait, certains auteurs classent sous la dénomination d'exoglucanase indifféremment des enzymes libérant, soit du cellobiose (à partir de l'extrémité non réductrice) (ERIKSSON, 1981a ; ERIKSSON et PETTERSON, 1975b), soit du glucose, alors que cette dernière enzyme devrait être désignée sous le nom de 1,4 b-D-glucane glucosehydrolase (E.C. 3.2.1.74).

- l'endoglucanase ou 1,4 -b-glucane - 4 - glucanohydrolase (EC. 3.2.1.4) (= "enzyme CX") plus communément dénommée CM-cellulase en raison de la nature du substrat habituellement utilisé pour la tester: la carboxyméthyl-cellulose. Cette enzyme qui hydrolyse les liaisons b-(1-->4) "au hasard" le long de la chaîne n'exerce son activité que sur de la cellulose de structure amorphe et sur des cellodextrines à longue chaîne.

- la cellobiase ou b-glucosidase (E.C. 3.2.1.21) hydrolyse le cellobiose (et les oligomères, de faible taille) en glucose. Il convient de rappeler que la b-glucosidase est le plus fréquemment testée à l'aide d'un substrat de synthèse, le p-nitrophényl-b-D-glucoside. Les enzymes dont l'activité est mesurée de cette manière devraient être appelées des aryl-b-glucosidases ; certaines d'entre elles sont incapables d'hydrolyser le cellobiose (BUCHT et ERIKSSON, 1969) et ne font donc pas partie du système enzymatique dégradant la cellulose.

L'exoglucanase et l'endoglucanase agissent de manière synergique. D'après REESE et al. (1950), la première a pour rôle de modifier la cellulose hautement polymérisée pour permettre à la seconde d'hydrolyser le polymère. Actuellement on pense que les rôles sont inversés: l'endoglucanase provoque la rupture de la chaîne au niveau des régions amorphes de la microfibrille de cellulose multipliant ainsi le nombre d'extrémités non réductrices sièges de l'activité de l'exoglucanase (ERIKSSON et PETTERSSON, 1975 ; GHOSE et al., 1981 ; WOOD et McCRAE, 1972 ; 1978 ; HIGHLEY, 1977).

Figure 15 - Schéma de la cellulolyse (d'après GHOSE et al., 1981).



Représentation schématique des différentes étapes de la biodégradation de la cellulose

Tableau 6

Activités enzymatiques (U/ml) présentes dans les filtrats de culture de *P. noxius* (PN) et de *R. lignosus* (RL) mis en oeuvre au cours des essais d'hydrolyse enzymatique de l'Avicel et du cellobiose.

Activités enzymatiques	Milieux réactionnels comportant un filtrat de		RL/PN
	<i>R. lignosus</i> (RL)	<i>P. noxius</i> (PN)	
b-glucosidase	2 440	1 026	0,42
a-galactosidase	34	3 276	96
b-galactosidase	530	2 291	4,3
Pectinase	2,2	55	25
Xylanase	19,4	232	12
Laminarinase	17,1	132	18
"Avicelase"	1,5	4,6	3
CM-cellulase			
- AR (viscosimétrie)	4 444	98 160	22
-pouvoir réducteur(PR)	4	26,3	6,6
- AR/PR	1 111	3 730	-
CM-cel.(AR)/b-glucosidase	0,45	96	-

Les deux types de filtrat proviennent de cultures sur papier filtre âgées de 13 jours. Les activités enzymatiques correspondent à des filtrats concentrés 10 fois. Ici les rapports PN/RL ont une réelle signification physiologique.

Enfin, si ce schéma est habituellement respecté par les agents de pourriture blanche, en revanche les agents de pourriture brune, qui ne synthétisent généralement pas d'enzyme de type "C1" (HIGHLEY, 1977) doivent disposer d'un système enzymatique, ou non enzymatique, permettant de dépolymériser au moins partiellement la cellulose, de manière à détruire sa structure cristalline originelle et la rendre apte à une dégradation complète par l'endocellulase (CX). D'après KOENIGS 1972, 1974) et HIGHLEY (1980), le système H_2O_2/Fe^{++} pourrait jouer ce rôle, l'eau oxygénée nécessaire au fonctionnement d'un tel système étant produite extracellulairement par le champignon lui-même.

Des travaux plus récents remettent cependant cette théorie en question. Selon HIGHLEY (1982), seul le radical .OH agirait sur la cellulose, le système $H_2O_2/.OH$ serait produit intracellulairement et excrété (ou relargué dans le milieu à la suite de la lyse de filaments mycéliens) sous la forme d'un complexe non affecté par les composés chimiques capables de "capter" l'eau oxygénée et ce type de radicaux.

Concernant la dégradation enzymatique de la cellulose par *R. lignosus* et *P. noxius*, nous avons démontré que ces champignons synthétisent et excrètent une endoglucanase (CM-cellulase) et une aryl-b-glucosidase. D'après les précisions que nous venons d'apporter sur les systèmes cellulolytiques, ils ne dégraderont la cellulose native de manière efficace, que dans la mesure où ils disposent d'une exoglucanase. Enfin il reste à démontrer que l'aryl-b-glucosidase testée est capable d'hydrolyser le cellobiose et donc de participer à la dégradation de la cellulose.

Ces essais ont été réalisés à la fois sur un plan qualitatif et quantitatif en utilisant des filtrats provenant de cultures des champignons sur milieu "papier filtre". Les cultures étaient âgées de 13 jours et les filtrats ont été concentrés (X10) avant mise en oeuvre. En dehors de la réalisation des tests d'activité classiques nous avons fait agir ces filtrats concentrés sur de l'Avicel et du cellobiose. Le premier substrat est une cellulose microcristalline dégradée uniquement par l'exoglucanase et permet donc de doser cette enzyme (GHOSE et al., 1981 ; SADDLER et KHAN, 1980). Le second substrat permet d'identifier la cellobiase.

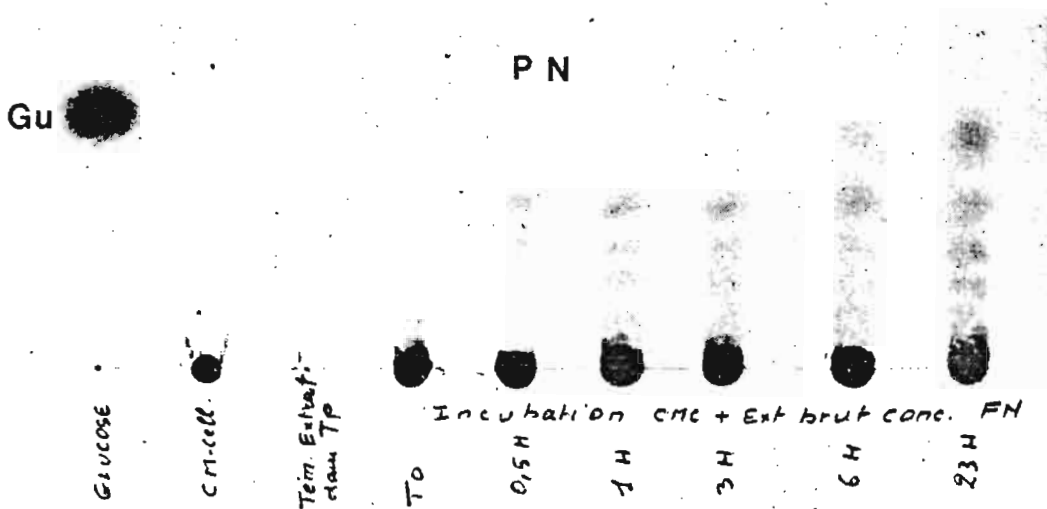
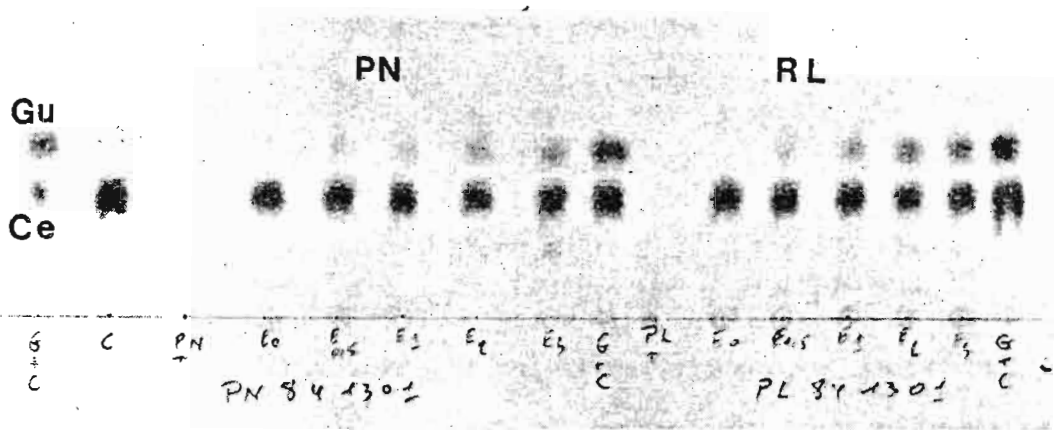
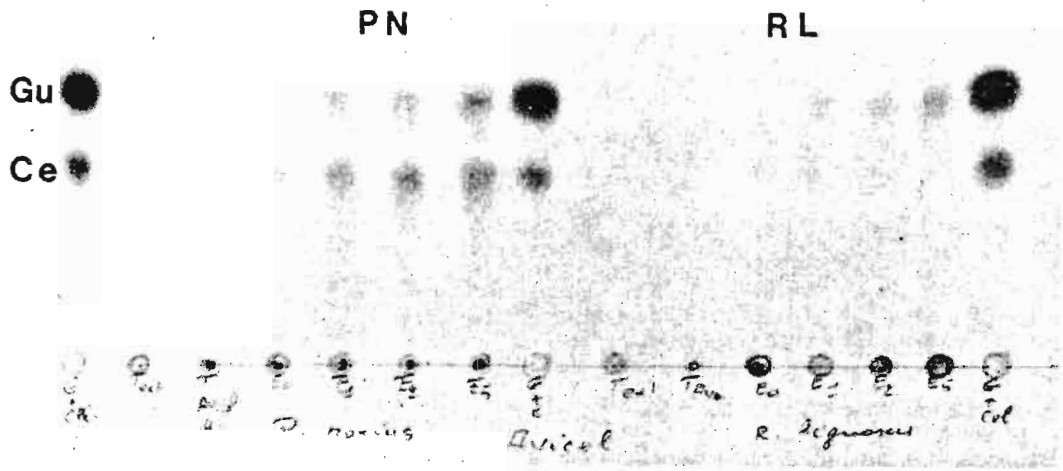
a) Identification d'une exoglucanase

1° Aspect quantitatif

Le tableau 6 indique l'activité des différentes enzymes présentes dans les filtrats concentrés et, pour chacune d'entre elles, le rapport de l'activité du filtrat de culture de *P. noxius* sur celle du filtrat de *R. lignosus*.

Les résultats montrent que les filtrats de culture des deux champignons comportent bien une activité exoglucanase hydrolysant l'Avicel.

Figure 16 - Analyse par chromatographie sur couche mince de gel de silice des sucres provenant de l'Hydrolyse, par des filtrats de culture de *R. lignosus* et de *P. noxius*, de: **A)** l'Avicel; **B)** du cellobiose; **C)** de la cellulose. (voir la légende des figures p. 77).



2° Aspect qualitatif :

Comme signalé plus haut deux types d'exoglucanase ont été décrits : l'une libérant du glucose, l'autre du cellobiose, à partir de la cellulose hautement polymérisée.

Afin de préciser la nature exacte de l'activité enzymatique, nous avons séparé les produits de réaction par chromatographie sur gel de silice.

* Action du filtrat de culture de *P. noxius* sur l'Avicel

Le chromatogramme de la figure 16A a permis d'identifier deux sucres dans le milieu réactionnel : le glucose et le cellobiose. La présence du cellobiose permet d'affirmer que le milieu réactionnel contient une activité 1,4-b-glucane cellobiose-hydrolase (CBH).

Quant au glucose, il peut avoir deux origines différentes :

- hydrolyse de l'Avicel par une exoglucanase libérant des maillons glucose

- hydrolyse, par une cellobiase, du cellobiose résultant de l'activité de la CBH sur l'Avicel.

Vu l'activité b-glucosidase relativement élevée du filtrat de culture utilisé au cours de ces essais, nous pensons que le glucose provient vraisemblablement de l'hydrolyse du cellobiose. Seules des expériences réalisées avec des enzymes purifiées permettraient de trancher entre les deux hypothèses proposées.

* Action du filtrat de culture de *R. lignosus* sur l'Avicel

Le chromatogramme (Fig. 16A) révèle la présence d'un seul sucre, le glucose, dans le milieu réactionnel. Cependant, étant donné l'activité b-glucosidase extrêmement élevée, particulièrement en regard de la faible activité "avicelase", il n'est pas exclu que l'absence d'accumulation de cellobiose soit due au fait que ce sucre est hydrolysé en glucose dès sa formation.

Cette hypothèse est indirectement confortée par le fait que du cellobiose est libéré à partir de la sciure de bois. Encore que dans ce cas particulier la production de cellobiose puisse provenir de l'action conjuguée de la CM-cellulase

Fig. 16: Analyse par chromatographie sur couche mince de gel de silice des produits d'hydrolyse: A) de l'Avicel (milieu réactionnel: 1ml de suspension d'Avicel à 1% dans du tampon citrate 0,01M à pH 4,6 + 100 µl de filtrat concentré). B) du cellobiose (milieu réactionnel: 100 µl de cellobiose à 0,01M dans le tampon citrate + 20 µl de filtrat concentré; pour A) et B) la composition enzymatique des filtrats est celle indiquée dans le tableau 6. C) de la CM-cellulose (milieu réactionnel: 1ml de CM-cellulose à 0,5% dans le tampon citrate 0,025M à pH 4,6 + 100 µl de filtrat de culture; composition enzymatique du milieu réactionnel: voir le tableau 5). Systèmes de migration: propanol-eau pour A) et B); butanol-acide acétique-eau pour C). GU: glucose; CE: cellobiose; Te et TA: témoins filtrats et Avicel; Eo ...: temps d'incubation en heure.

sur les zones de microfibrilles ayant perdu leur structure cristalline, et de la β -glucosidase sur le mélange de cellodextrine qui en résulte. Les coupures au hasard d'une part, le raccourcissement régulier des chaînes de cellodextrines d'autre part, conduisent nécessairement à la production, en principe transitoire, d'une certaine quantité de cellobiose. Il n'en demeure pas moins que les résultats de nos essais prouvent que *R. lignosus* excrète bien des exoglucanases.

Enfin la différence d'activité exoglucanase existant entre les filtrats de culture de *R. lignosus* et ceux de *P. noxius* permet de rendre compte de la différence d'activité de ces mêmes filtrats sur la sciure d'Hévée.

b) Identification d'une activité cellobiase.

Les hypothèses émises plus haut concernant l'origine du glucose apparu au cours de l'hydrolyse de l'Avicel ne sont légitimes que dans la mesure où le filtrat de culture contient effectivement une activité cellobiase.

La recherche d'une telle activité a été réalisée au plan qualitatif en incubant du cellobiose en présence de filtrat de culture de l'un et l'autre champignon. La composition, en oses, du milieu réactionnel est analysée par chromatographie sur gel de silice, après des temps variables d'incubation.

Le chromatogramme de la figure 16B montre sans ambiguïté l'hydrolyse du cellobiose en glucose. **Les deux champignons excrètent donc bien des enzymes de type cellobiase.**

Au plan quantitatif on note l'existence d'une corrélation entre la quantité de glucose qui s'accumule dans les milieux réactionnels (intensité des spots du chromatogramme) et l'activité "aryl- β -glucosidase" des filtrats de culture (Tabl.6). Ceci nous conduit à penser que l'activité "aryl- β -glucosidase" des filtrats de culture correspond en fait à une activité cellobiase.

c) Vérification du mode de dégradation du substrat ("endo" ou "exo") par les CM-cellulases.

Une technique de détermination du type d'action, exo ou endo, exercée par les polysidases consiste à comparer leur effet d'une part sur le degré de polymérisation du substrat (chute de viscosité par exemple) et d'autre part sur la libération d'oses dans le milieu réactionnel (augmentation du pouvoir réducteur).

Dans le cas présent on observe une chute rapide de la viscosité du milieu réactionnel alors que l'augmentation du pouvoir réducteur est faible voire négligeable. Ainsi, dans les conditions de test mis en oeuvre, la différence entre les deux types d'activité apparaît clairement lorsque l'on compare les rapports des activités enregistrées par les deux techniques (Tabl. 6.):

CM-cellulase de *P. noxius*: AR / p.réducteur : 98160/4,55 = 3730

CM-cellulase de *R. lignosus*: AR / p.réducteur : 4444/4 = 1111

(A titre de comparaison, pour l'activité pectinolytique (cf. *infra*), testée dans des conditions tout à fait comparables, les activités étant exprimées dans les mêmes unités, le rapport (AR/ pouvoir réducteur) est égal à 1,05). Un tel résultat indique que l'activité CM-cellulase conduit à une scission de la cellulose selon le mode "endo". Ce mode d'action a été confirmé, dans le cas d'un filtrat de culture de *P. noxius*, par l'analyse des produits de réaction par chromatographie sur gel de silice. Le chromatogramme (Fig. 16C) révèle que l'hydrolyse du substrat conduit à la formation de produits de réaction de degré de polymérisation variable et non uniquement au monomère (ou, éventuellement, au dimère) comme le ferait les enzymes de type "exo".

L'ensemble de ces résultats montre que *R. lignosus* et *P. noxius* disposent d'un équipement très complet en enzymes cellulolytiques (exoglucanases + endoglucanases + cellobiases) leur permettant de dégrader efficacement la cellulose du bois d'Hévéa. Concernant cet équipement, la différence entre les deux champignons réside non pas au niveau qualitatif mais à un niveau quantitatif.

3. LE COMPLEXE PECTINOLYTIQUE DE *P. NOXIUS* ET *R. LIGNOSUS*

Les matières pectiques sont dégradées par des enzymes dont la nomenclature, les mécanismes réactionnels et le rôle, notamment dans le développement du processus pathogénique, ont été précisés par BATEMAN (1968) et BATEMAN et MILLAR (1966). Deux catégories d'enzymes existent, l'une responsable de la déméthylation des pectines (pectine-pectyl-méthyle estérase = PME), l'autre, responsable de la dépolymérisation de la macromolécule dont le produit final est l'acide galacturonique (ou son ester méthylique). Cette dernière catégorie regroupe des enzymes agissant soit par voie hydrolytique soit par voie transéliminasiqne, les unes et les autres étant de type "endo" ou "exo" et dépolymérisant préférentiellement soit les acides pectiques (faible pourcentage de méthylation des carboxyles en C6), soit les pectines hautement méthylées.

Compte-tenu des résultats précédemment acquis, il convenait de vérifier:

- si *R. lignosus* possède ou non la capacité à dégrader les matières pectiques et par conséquent s'il excrète des enzymes adéquates,
- la nature des enzymes pectinolytiques excrétées par *P. noxius* et que nous avons désignées globalement et improprement sous le nom de "pectinases".

Figure 17 - Dégradation, *in vivo*, de la lamelle moyenne par *R. lignosus*: observation au microscope électronique: 1) Racine d'Hévéa sain 2) Racine d'Hévéa parasité (voir légende des figures p. 80).

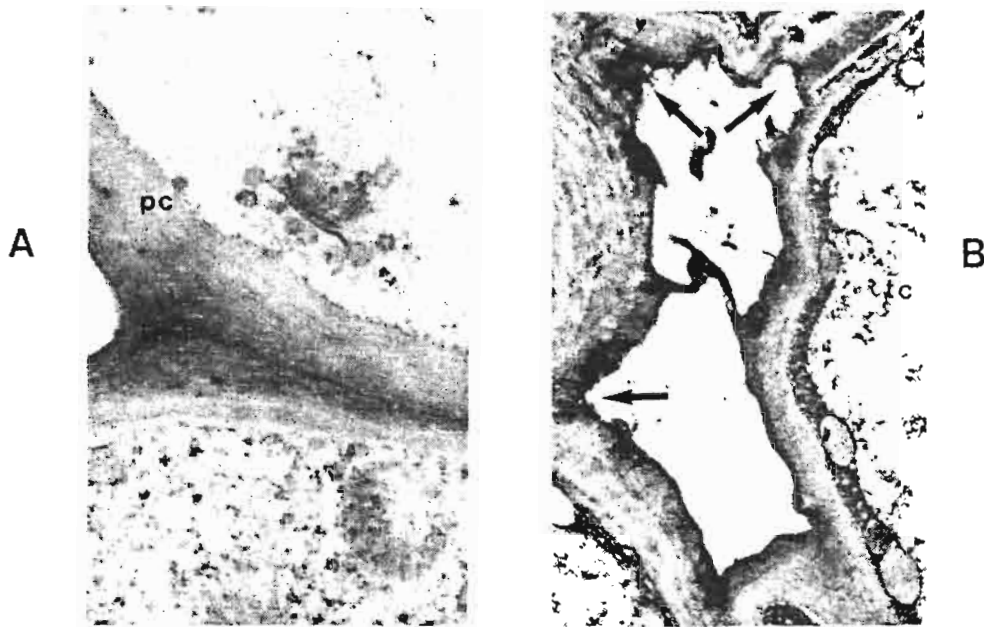
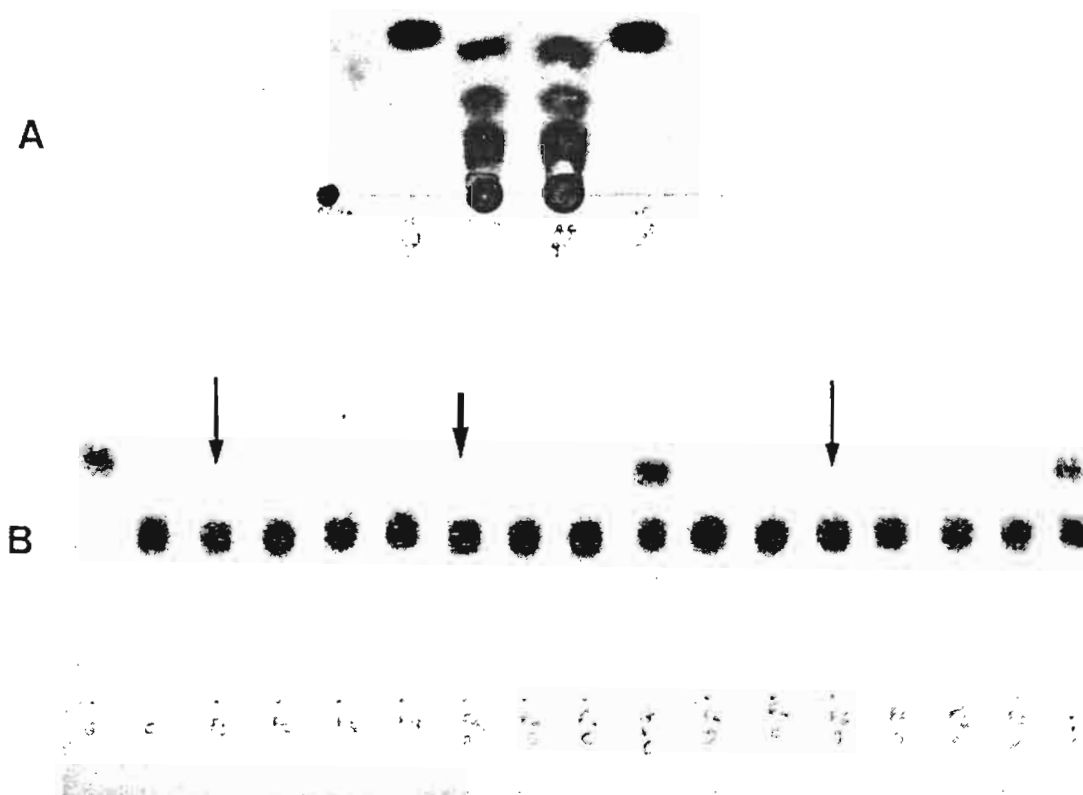


Figure 18 - Analyse par CCM de gel de silice: **A)** des produits d'hydrolyse du polypectate de sodium par la pectinase purifiée de *P. noxius*; **B)** du cellobiose par différentes fractions séparées par chromatographie sur DEAE-cellulose et Sephadex G75. (légende des figures: voir p. 81).



a) *R. lignosus* excrète-t-il des enzymes pectinolytiques?

Comme nous l'avons indiqué plus haut, les tests d'activité pectinolytique effectués soit sur des filtrats de culture, soit sur des extraits de tissus infectés par *R. lignosus* ont régulièrement fourni des résultats négatifs, ou, au mieux, des valeurs proches de la limite de sensibilité de la méthode analytique.

Cependant l'observation de coupes de tissus au microscope électronique (Fig. 17, 1 et 2) révèle une forte altération de la lamelle moyenne dans des tissus non lignifiés, essentiellement constituée de matières pectiques, témoignant de l'activité pectinolytique exercée par ce champignon.

Nous avons tenté de mettre cette activité en évidence, *in vitro*, en le cultivant le champignon sur un milieu (bouillon de sciure d'Hévéa) supplémenté en polypectate de sodium (2 %) ou en Pectine R.B. (1 % ; pectine hautement méthylée). Les variations de viscosité de ce milieu sont mesurées après respectivement 5 et 15 jours de culture, par comparaison avec la viscosité de milieux, de même composition et de même âge, non ensemencés. Les résultats obtenus sont les suivants:

Temps de culture	chute de viscosité du milieu (%)	
	5 j.	15 j.
Milieu + polypectate	22	75
Milieu + pectine	24	68

Ils traduisent une faible, mais néanmoins réelle, activité dépolymérisante du champignon à l'égard des matières pectiques.

Enfin une telle activité a été mise en évidence récemment, par la technique classique (mesure de la libération des sucres réducteurs) dans des filtrats concentrés provenant de cultures sur papier filtre (Tableau 6).

Fig. 17: Dégradation de la lamelle moyenne (*in vivo*) par *R. lignosus*: observation au microscope électronique: **1**) Racine d'Hévéa sain : Coupe transversale au niveau du phloème (lm = lamelle moyenne; pc = paroi cellulosique); (x 22 500). **2**) Racine d'Hévéa parasitée par *R. lignosus*. Dégradation de la lamelle moyenne (flèches) entre deux tubes criblés (tc) du phloème. (x 6 000).

Fig. 18: Chromatographie sur ccm de gel de silice des produits d'hydrolyse **A**) du polypectate de sodium par la pectinase purifiée à partir d'un filtrat de culture de *P. noxius* ; Pect: polypectate de sodium; AG: acide galacturonique; E: milieu réactionnel. **B**) du cellobiose différentes fractions isolées au cours de la purification des enzymes de *P. noxius* (voir schéma de purification).

Par ailleurs l'analyse chromatographique confirme l'activité dépolymérisante de ce même filtrat sur le polypectate de sodium : spot d'acide galacturonique (après 6 heures d'incubation du milieu réactionnel) visible, bien qu'à l'état de traces.

b) Le complexe pectinolytique de *P. noxius*

P. noxius excrète des quantités relativement importantes de "pectinases" laissant supposer une action efficace sur les matières pectiques de la lamelle moyenne des tissus, en particulier des tissus non lignifiés. Une telle action est en effet observée sur des coupes de tissus.

L'analyse des filtrats de culture a permis d'identifier la présence d'une **pectine-méthyl estérase** (P.M.E.) relativement active. En effet, l'incubation (en milieu non tamponné) d'une pectine hautement méthylée en présence de la solution enzymatique provoque une acidification rapide du milieu réactionnel (témoin de l'hydrolyse de l'ester méthylique en C6 conduisant à la formation d'alcool méthylique et de la fonction acide carboxylique libre).

L'identification des **enzymes de dépolymérisation** a été réalisée en plusieurs étapes :

* Détermination du mécanisme réactionnel (hydrolyse ou transélimination : identification de produits de réaction à l'aide du réactif à l'acide thiobarbiturique).

Cette technique mise au point par SHERWOOD (1966) permet d'identifier, dans le milieu réactionnel, l'acide galacturonique et l'acide anhydrogalacturonique résultant, respectivement, des activités hydrolytique et transéliminasiq ue des enzymes. En effet les produits de condensation entre ces deux monomères et le réactif présentent des pics d'absorption à des longueurs d'onde distinctes : 515nm pour l'acide galacturonique, 548nm pour l'acide anhydrogalacturonique.

Afin de distinguer plus nettement les deux activités, des incubations sont réalisées en parallèle à deux pH : 4,6 et 7,5, les enzymes pectiques à caractère hydrolytique présentant généralement une activité optimale en milieu acide,, alors que les transéliminases (ou lyases) sont plus actives en milieu alcalin.

La Figure 19 révèle que *P. noxius* excrète les deux types d'enzyme. Cependant des essais quantitatifs ont montré que l'activité de l'enzyme à caractère hydrolytique est toujours très supérieure à celle de la transéliminase. Cette dernière n'est par ailleurs identifiable de manière nette que dans les extraits de bûchettes infectées. Ainsi, *P. noxius* excrète dans les milieux de culture deux types d'enzymes capables de dépolymériser les matières pectiques:

- "pectine" hydrolase
- "pectine" lyase

Figure 19 - Spectre des produits de condensation obtenus à l'aide du test à l'acide thiobabiturique.

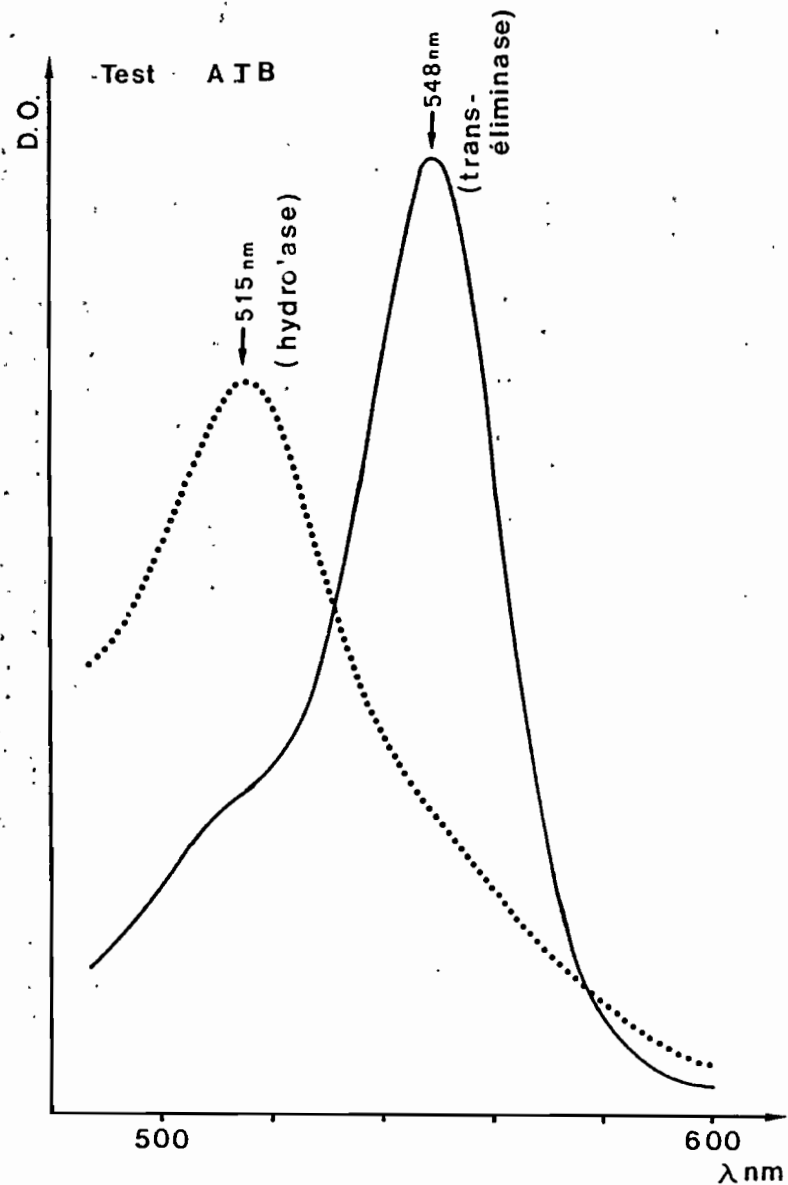
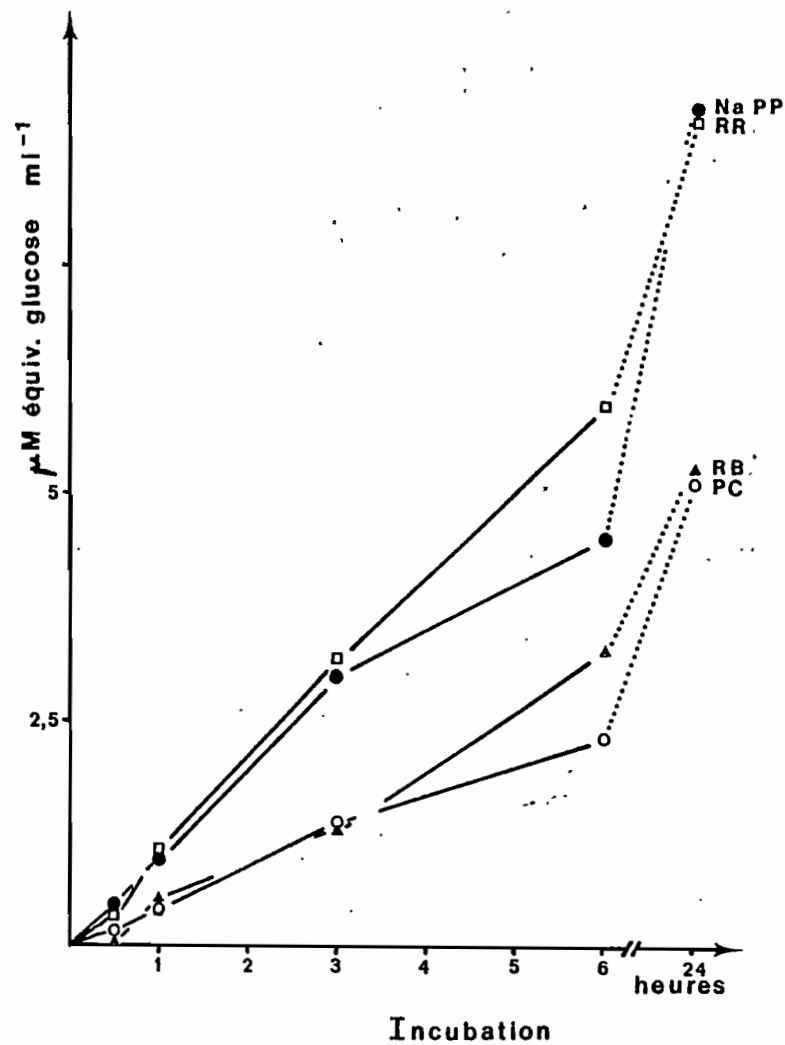


Figure 20 - Cinétique d'hydrolyse de différentes matières pectiques par un filtrat de culture de *P. noxius* (légende de la figure; voir p.).



* Détermination du substrat préférentiel

Cette détermination a été effectuée, pour l'enzyme à caractère hydrolytique, en faisant agir un filtrat de culture sur divers substrats : acide polygalacturonique, pectine faiblement méthylée (pectine Ruban Rouge (RR) Unipectine), pectine hautement méthylée (pectine "Ruban Brun" (RB) Unipectine et pectine de citrus (calbiochem). Les résultats (Fig. 20) indiquent que l'activité pectinolytique s'exerce sur les différents types de substrats, mais préférentiellement sur ceux dont le degré de méthylation est le plus faible.

On peut en déduire que la pectine-méthyl estérase joue vraisemblablement un rôle non négligeable dans la dégradation des matières pectiques dans la mesure où elle transforme la pectine, généralement hautement méthylée, en un substrat plus facilement dépolymérisable.

* Détermination du mode d'activité: "endo" ou "exo"

Cette détermination a été réalisée sur une "pectinase" purifiée par des chromatographies successives sur DEAE-cellulose et sur gel de Sephadex G100 (Fig. 22A). Cette préparation, dépourvue de toute autre polyosidase et glycosidase présente les activités spécifiques suivantes :

- mesure viscosimétrique: 183 AR/ml
- mesure par dosage des sucres réducteurs libérés: 173 U/ml
- rapport de ces deux mesures: AR/pouvoir réd. : 1,05

Si l'on compare la valeur de ce rapport à celui obtenu pour la CM-cellulase on en conclut que la pectinase doit présenter une activité de type exo.

En fait, la vérification du mode d'activité de l'enzyme, par analyse du milieu réactionnel (CCM de gel de silice; Fig. 18A) révèle que l'hydrolyse enzymatique du polypectate de sodium conduit à des produits de réaction de degré de polymérisation variable et non au seul acide galacturonique. L'enzyme est donc de type endo.

Cependant une analyse comparable réalisée au cours d'une cinétique de dégradation du polypectate de sodium révèle que l'acide galacturonique s'accumule très rapidement, dès l'initiation de la réaction. Il semblerait donc que la pectinase, bien que de type "endo" ne détache du polymère que des fragments de petite taille eux-mêmes hydrolysés en monomères. Ceci expliquerait le faible effet sur la viscosité du substrat en solution (chute de viscosité très lente) et, par contre, la libération rapide d'"équivalents réducteurs" à partir du polymère.

Fig. 20: Cinétique d'hydrolyse de différentes matières pectiques par un filtrat de culture de *P. noxius* (milieux réactionnels: substrat à 0,5% dans du tampon citrate 0,025M à pH 4,6 + filtrat de culture de *P. noxius*(0,63 unité de pectinase/ml de milieu réactionnel). NaPP: polypectate de sodium; RR et RB: respectivement: pectine Ruban Rouge (faiblement méthylée) et pectine Ruban Brun (hautement méthylée); PC: pectine de Citrus hautement méthylée.

Ces résultats sont voisins de ceux obtenus par BARTHE et al., (1981) pour la polygalacturonase-II excrétée par *Colletotrichum lindemuthianum*. Ces auteurs montrent que cette enzyme, qui hydrolyse l'acide polygalacturonique par voie "endo", provoque rapidement l'accumulation d'acide galacturonique et d'oligomères de faible taille. Au stade ultime le polymère est hydrolysé en mono-, di- et trimère, ces deux derniers n'étant pas, à leur tour, hydrolysables par l'enzyme.

En définitive et selon la nomenclature de BATEMAN et MILLAR (1966) la pectinase excrétée par *P. noxius* est une : endo-polygalacturonase (endo-PG) = endo-poly- α -1,4- galacturonide glycanohydrolase).

4. LES HEMICELLULASES

On regroupe sous ce terme des enzymes hydrolysant la liaison intermonomérique de divers polymères osidiques autres que la cellulose et les matières pectiques. Parmi les macromolécules les plus représentatives de ce groupe on peut citer des homopolymères (xylanes, arabanes, mannanes) et des hétéropolymères tels que les galactomananes, arabinogalactanes...

Deux enzymes ont été identifiées hydrolysant respectivement le xylose et la lamaminarine (b-(1→3)-glucane). Leur activité est relativement plus élevée que celle de la pectinase au moins dans le cas de filtrats de cultures sur papier filtre (Tableau 6).

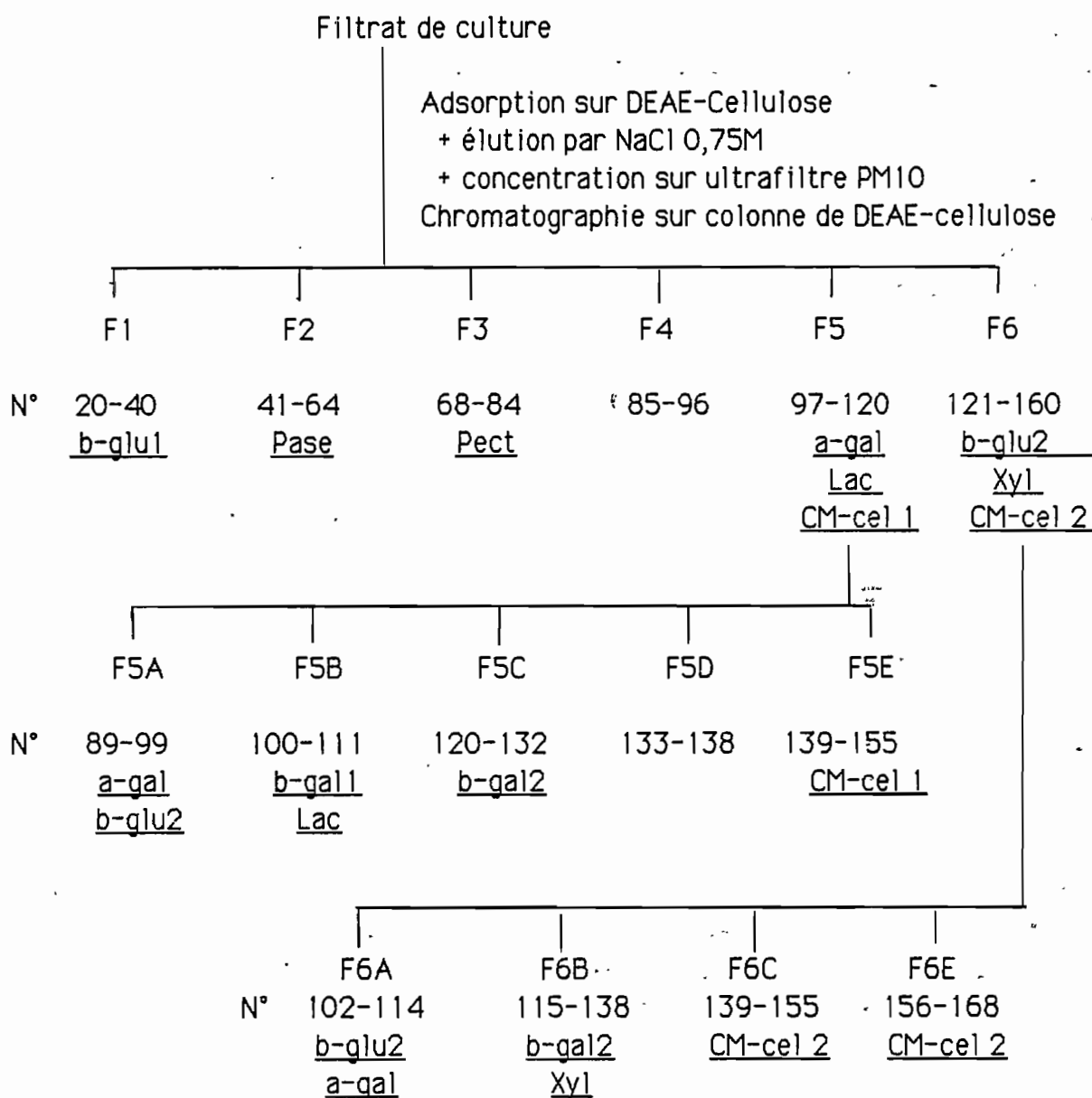
5. PURIFICATION PARTIELLE ET DETERMINATION DE QUELQUES CARACTERISTIQUES PHYSICOCHEMICHES DES ENZYMES EXCRETEES PAR *P.NOXIUS*.

Cette étude a été réalisée afin de compléter les informations concernant les enzymes excrétés par *P. noxius*. Seuls des filtrats de culture de ce champignon ont été analysés pour des raisons techniques: il est en effet seul à excréter en abondance la plupart des enzymes.

De nombreux essais d'isolement et de purification ont été réalisées ; nous n'en présenterons ici qu'une seule, la plus complète en ce sens qu'elle prend en compte la plupart des enzymes étudiées. Pour complément d'information des diagrammes d'éluion: (sur gel de Sephadex G75, G100 et G150) sont présentés provenant d'autres purifications partielles.

Le schéma général de la purification partielle est le suivant (les numéros des fractions correspondent à ceux des Figures 21 A-D; l'activité des enzymes

des différentes fractions est indiquée dans les Tableaux 7 A-D; seule la position du "pic" d'activité de chaque enzyme, est indiquée sur le schéma):



a) Remarques générales:

Le filtrat, provenant de cultures de *P. noxius* en milieu Hévéa, présente une coloration brune intense et contient une forte concentration en composés phénoliques ; la DO_{280} initiale de la solution avoisine en effet 3 unités. L'étape d'adsorption des enzymes sur DEAE-cellulose, type DE52, suivie d'une élution

Tableau 7

Purification partielle de quelques enzymes excrétées par *P. noxius*:

A - Activités enzymatiques contenues dans le filtrat de culture brut et dans la solution "batch-DE52".

Enzymes	Filtrat de culture D0280 totales = 14416 D0280/D0260 = -				"Batch" DE 52 D0280 totales = 487,8 D0280/D0260 = 1,02			
	Activité			Taux purifica.	Activité			Taux purifica.
	Totale	/ml	/D0280		Totale	/ml	/D0280	
Pase	53000	20	3,8	1	5447	127	11,2	2,9
β-glu	28090	10,6	1,9	1	19322	449	30,6	20,8
α-gal	94340	35,6	6,5	1	91322	2128	187,2	28,8
β-gal	29945	11,3	2,1	1	18954	441	36,9	18,5
Lacc	148400	56	10,3	1	133300	3107	273,3	26,5
Pect	17755	6,7	1,2	1	7647	1,8	15,7	13,1
Xyl	23320	8,8	1,6	1	13016	303	26,7	16,6
CM-cel.	1365980	515,5	94,8	1	1303000	30300	2671,1	28,2

Tableau 7

Purification partielle de quelques enzymes excrétées par *P. noxius*:

B - Activités enzymatiques présentes dans les différentes fractions séparées par chromatographie sur DEAE-cellulose (pour la référence des fraction, se rapporter au schéma de purification p87).

Enzymes	F1 { D0280 totales= 9,93 D0280/D0260 = 0,89				F2 { D0280 totales = 16,7 D0280/D0260 = 1,04				F3 { D0280 totales = 24,2 D0280/D0260 = 1,17			
	Activité			Taux purifica.	Activité			Taux purifica.	Activité			Taux purification
	Totale	/ml	/D0280		Totale	/ml	/D0280		Totale	/ml	/D0280	
Pase	0	0	0	-	7597	77,5	455	120	770	9,6	31,8	8,4
β-glu	1014	13,2	102	54	0	0	0	-	0	0	0	-
α-gal	0	0	0	-	0	0	0	-	0	0	0	-
β-gal	0	0	0	-	0	0	0	-	3445	43	142,3	68
Lacc	-	-	-	-	0	0	0	-	2026	25	83,7	8
Pect	0	0	0	-	0	0	0	-	2704	33,8	111,7	93
Xyl	0	0	0	-	392	4	23,5	15	176	2,2	7,3	4,6
CM-cel.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	F4 { D0280 totales= 25,2. D0280/D0260 = 0,98				F5 { D0280 totales= 38,4 D0280/D0260 = 1,05				F6 { D0280 totales = 77 D0280/D0260 = 1,0			
Pase	410	7,6	16,3	4,3	0	0	0	-	0	0	0	-
β-glu	0	0	0	-	875	8	23	12	6270	34	81	42
α-gal	16552	306	657	101	58550	542	1525	234	19364	106	251	38
β-gal	602	11	24	11	10123	94	264	125	4700	26	61	29
Lacc	10260	190	407	39	19980	185	520	51	2730	15	36	3,4
Pect	723	13	29	24	744	7	19	16	0	0	0	-
Xyl	308	5,7	12	8	505	5	13	8	4448	24	56	36
CM-cel.	-	-	-	-	198165	1835	5160	54	587096	3226	7625	80

Tableau 7

Purification partielle de quelques enzymes excrétées par *P. noxius*:
 C - Activités enzymatiques contenues dans différentes fractions séparées par filtration sur gel de Sephadex G75 de la fraction "F5-DE52" (préalablement isolée par chromatographie sur DEAE-cellulose; voir le schéma de purification p.87).

Enzymes	F A { D0280 totales = 1,6 D0280/D0260 = 1,14				F5 B { D0280 totales = 3,2 D0280/D0260 =				F5 C { D0280 totales = 1,8 D0280/D0260 = 1,28			
	Activité			Taux purifica.	Activité			Taux Purifica.	Activité			Taux purifica.
	Totale	/ml	/D0280		Totale	/ml	/D0280		Totale	/ml	/D0280	
β -glu	332	30,1	207	109	116	10,3	36	19	13	1	1	3,7
α -gal	18643	169,5	11650	1792	7987	713	2496	384	0	0	0	-
β -gal	125	11,4	78	37	1816	162	567	270	1637	128	909	433
Lacc	0	0	0	-	2072	185	647	63	213	16,7	118	11,5
CM-cel.	-	-	-	-	0	0	0	-	19392	1515	10773	114

F5 D { D0280 totales = 0,61
D0280/260 = 1,22

F5 E { D0280 totales = 1,7
D0280/D0260 = 1,08

β -glu	11	1,9	17,7	9	54	3,3	32	17
α -gal	0	0	0	-	0	0	0	-
β -gal	259	46	418	199	0	0	0	-
Lacc	0	0	0	-	0	0	0	-
CM-cel.								
- Vis.	41865	7476	67520	712	115830	7020	68135	718
- Red.	11,5	2,05	18,5	-	22,8	1,38	13,4	-

Tableau 7

Purification partielle de quelques enzymes excrétées par *P. noxius*:

D - Activités enzymatiques contenues dans différentes fractions séparées par filtration sur gel de Sephadex G75 de la fraction "F6-DE52" (préalablement isolée par chromatographie sur DEAE-cellulose; voir le schéma de purification p.87).

Enzymes \ Fractions	β -glu	α -gal	β -gal	Xyl	CM. cell
F6 A	40	110	25	12,7	0
F6 B	12	23	36,5	21,4	4 000
F6 C	0	0	10	13,8	6 600
F6 D	0	0	0	0	3 640

Activité spécifique en unités/ml.

Figure 21A,B - Chromatographie sur DEAE-cellulose: profil d'élution de différentes enzymes contenues dans un filtrat de culture de *P. noxius*

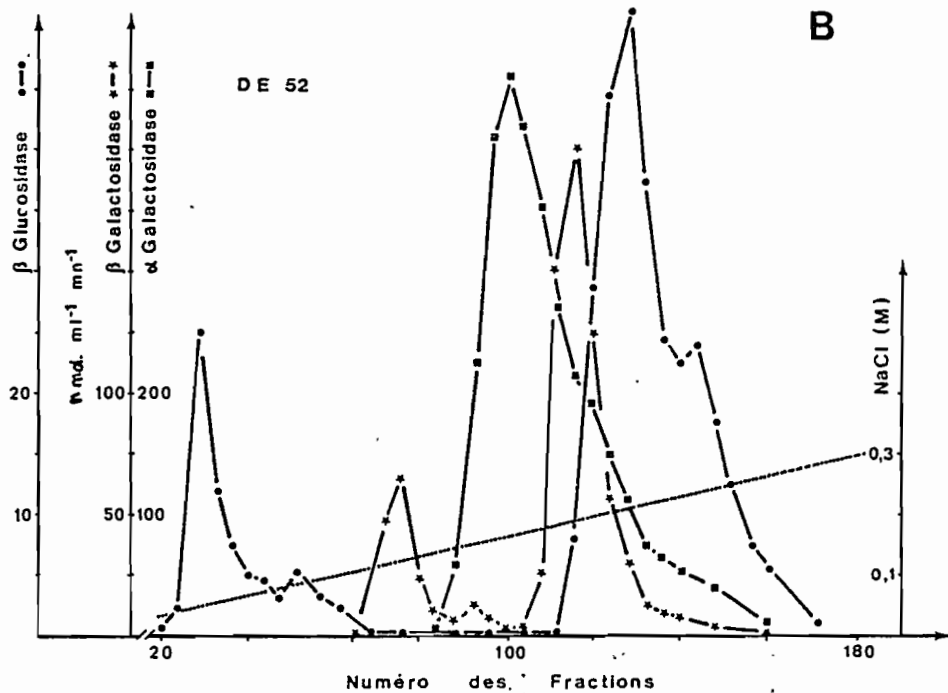
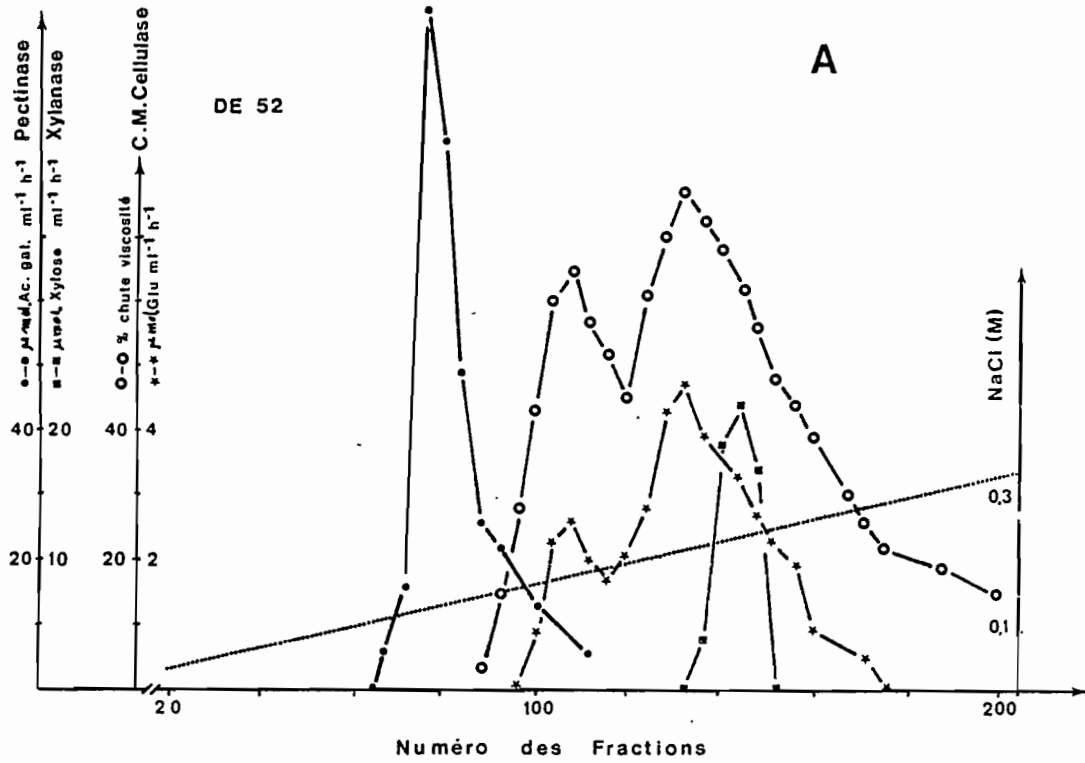
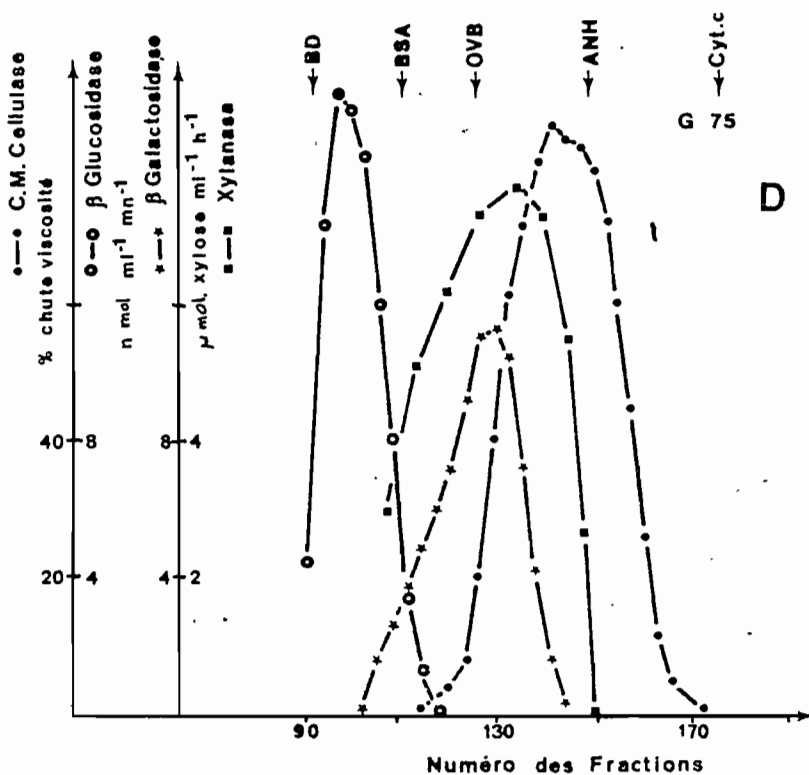
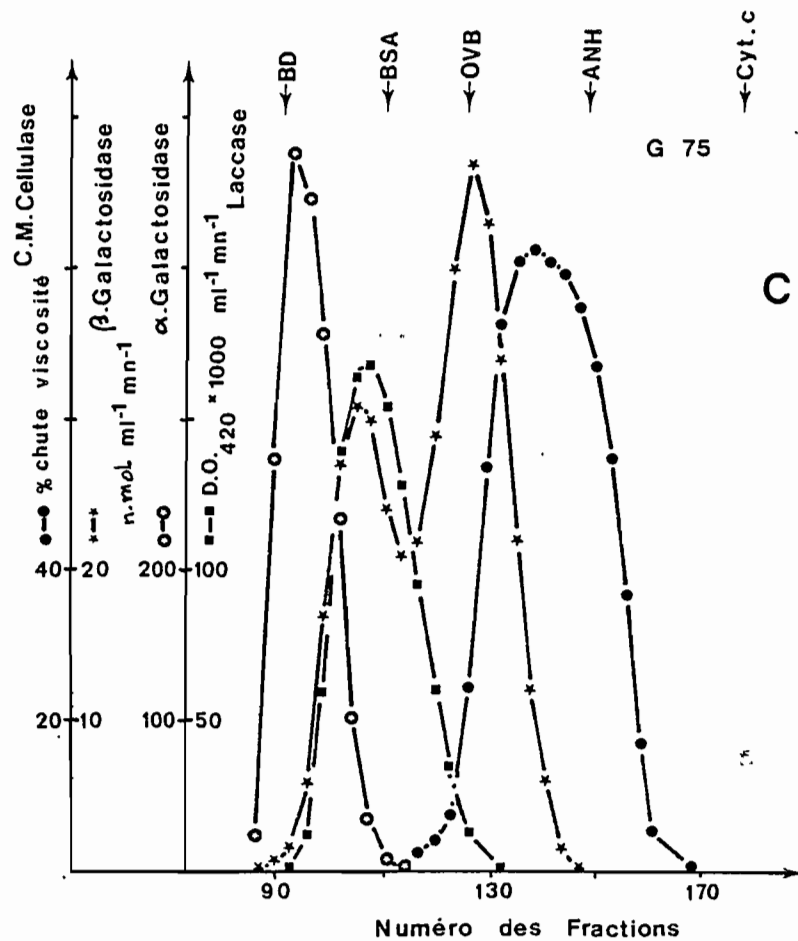


Figure 21 - Séparation de différentes fractions enzymatiques par filtration sur gel de Sephadex G75. **C)** Rechromatographie de la fraction "F5-DE52"; **D)** Rechromatographie de la fraction "F6-DE52" (pour la référence des fractions: voir le Scéma de la procédure de purification).



totale par une solution de force ionique élevée et d'une concentration sur ultrafiltre AMICON PM 10 conduit à éliminer plus de 96% des composés absorbant dans cette longueur d'onde et à concentrer les solutions enzymatiques. Le rendement de la première étape varie suivant la nature des enzymes ; il est particulièrement élevé pour les activités α -galactosidase, laccase et CM-cellulase; il est en revanche médiocre pour celle des pectinases et des phosphatase.

L'élimination de la majeure partie des composés phénoliques conduit à un taux de purification (apparent) particulièrement élevé.

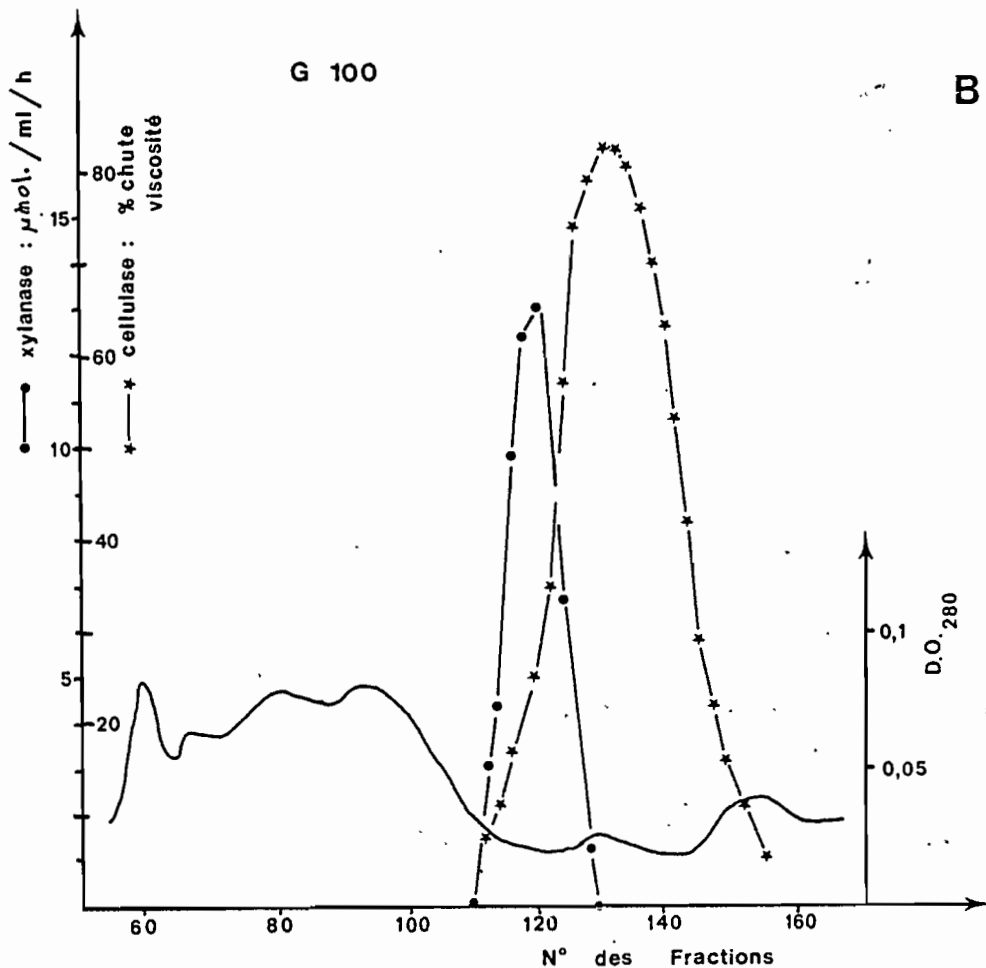
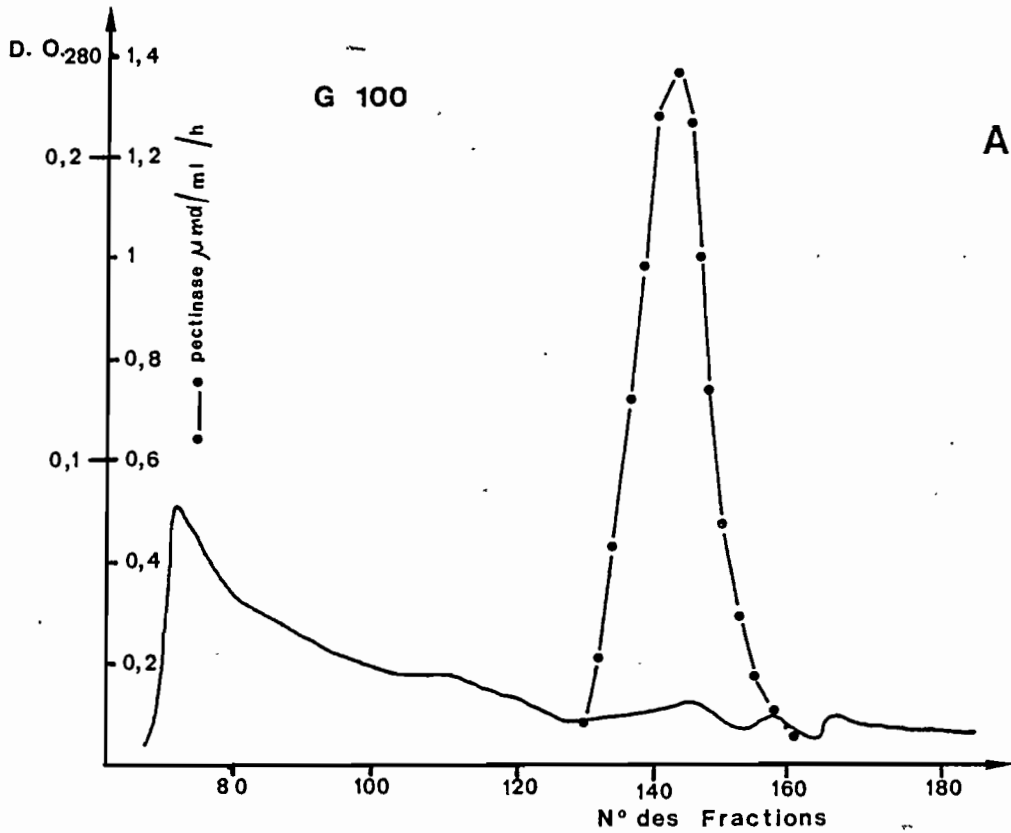
Les **résultats** (Fig. 21 A-D) montrent que certaines activités des filtrats bruts résultent de l'action conjuguée de plusieurs isoenzymes. C'est le cas pour les activités β -glucosidase, la β -galactosidase et la CM-cellulase (deux isoenzymes pour chacune d'entre elles). Concernant cette dernière, les tests ont été réalisés selon les deux méthodes classiques : par viscosimétrie et par dosage des sucres réducteurs ; ils révèlent que les deux isoenzymes hydrolysent la CM-cellulose selon le mode "endo".

Cette expérience de fractionnement a été mise à profit pour vérifier un certain nombre d'autres caractéristiques de l'équipement enzymatique de *P. noxius*:

b) Les aryl- β -glucosidases sont-elles des cellobiases?

Cette vérification a été réalisée en incubant, en présence de cellobiose, les différentes fractions isolées au cours de la purification des enzymes du filtrat de culture de *P. noxius* (fractions F1-->F4 (isolées par chromatographie sur DE52); F5A -->F5E et F6A --> F6D (chromatographie sur DE52 suivie d'une filtration sur Sephadex G75). Les produits de réactions ont été analysés par chromatographie sur couche mince de gel de silice.

Le diagramme de la figure 18B montre que la β -glucosidase 2 (fraction F5A) hydrolyse le cellobiose; cette enzyme appartient donc au groupe des cellobiases. L'enzyme 1 est également une cellobiase (son activité dans la fraction F1 étant très faible, seules des traces de glucose ont été libérées durant l'incubation, le spot correspondant n'est pas visible sur le document photographique). Les deux isoenzymes de la β -glucosidase sont donc capables d'hydrolyser le dimère naturel; elles sont par conséquent susceptibles de participer à la cellulolyse. *P. noxius* n'excrète pas deux types d'enzyme, l'un spécialisé dans l'hydrolyse d'hétérosides du type p-nitrophényl-glucoside, l'autre dans la rupture des liaisons osidiques, comme c'est le cas par exemple chez *Stereum sanguinolenum* (BUCHT et ERIKSSON, 1969).

Figure 22 A- Profil d'élution sur Sephadex G100 de la pectinase de *P. noxius*.Figure 22 B- Profil d'élution sur Sephadex G100, des CM-cellulase et Xylanase de *P. noxius*.

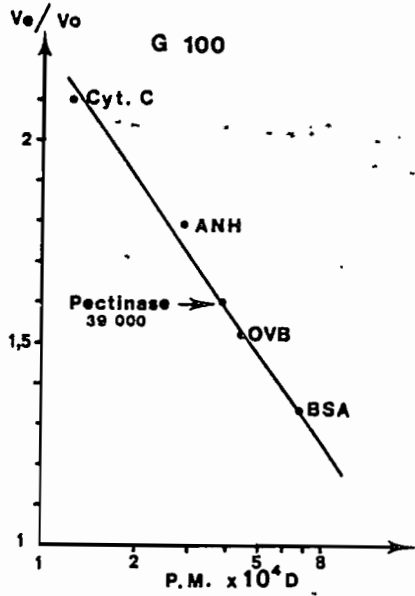
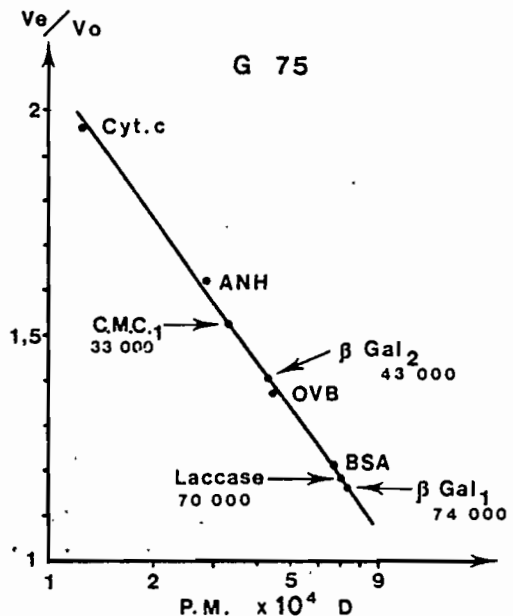
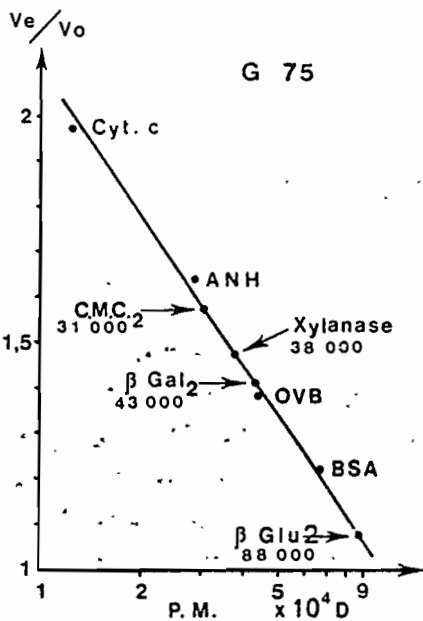
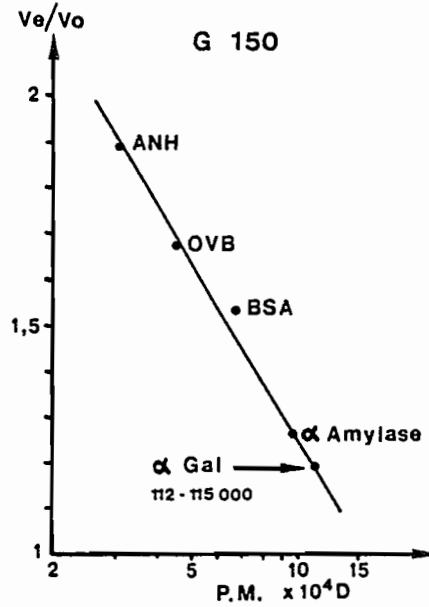
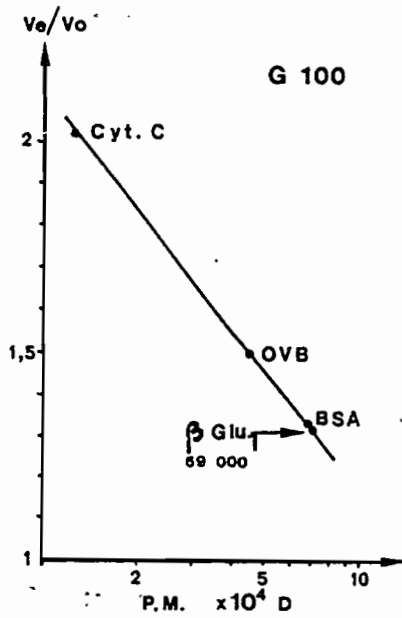


Figure 23 - Détermination graphique du PM de différentes enzymes isolées à partir du filtrat de culture de *P. noxius*



c) Les activités CM-cellulase et xylanase sont-elles dues à deux protéines enzymatiques distinctes?

Chez *Poria placentea* ces deux enzymes font partie d'un "complexe" non séparable en ses éléments (HIGHLEY et al., 1981). Certains auteurs pensent que la cellulase possède également une activité xylanasique ; ERIKSSON (1981a), pour sa part, estime que ces résultats sont dûs à une séparation imparfaite des deux enzymes et qu'en fait les deux activités sont à mettre au compte de deux protéines enzymatiques distinctes.

Dans le cas des enzymes excrétées par *P. noxius* et bien que leur purification ne soit pas parfaite, le décalage du pic "xylanase" par rapport à celui de la CM-cellulase (chromatographie sur G100 Fig. 22B) démontre l'existence de deux protéines distinctes spécialisées l'une dans la dégradation des xylanes, l'autre dans celle de la CM-cellulose.

d) Poids moléculaires et pH optimal d'activité des différentes enzymes.

Le poids moléculaire de la plupart de ces enzymes a été déterminé par filtration sur gel de Sephadex G75, G100 ou G150 étalonné à l'aide de protéines de PM connu. Ces déterminations ont été réalisées par co-chromatographie de la protéine dont le PM est à déterminer (repérée sur l'élutogramme par son activité catalytique) et des protéines marqueurs. La figure 23 présente la détermination graphique des PM des différentes enzymes excrétées par *P. noxius* (voir plus loin pour la détermination du PM des laccases et peroxydases). Parallèlement a été vérifié le pH optimum d'activité de ces enzymes. L'ensemble de ces caractéristiques est consigné dans le tableau 8.

6. REMARQUES SUR L'EQUIPEMENT ENZYMATIQUE DES DEUX CHAMPIGNONS

R. lignosus et *P. noxius* possèdent tous les deux un équipement très complet en matière d'enzymes intervenant dans la dégradation des polyosides pariétaux (Tableau 9). Ils sont donc, l'un et l'autre potentiellement aptes à effectuer des altérations similaires au niveau des parois cellulaires. Seul le niveau d'activité des enzymes diffère, *P. noxius* possédant des potentialités nettement supérieures à celles de *R. lignosus* : Comme nous l'avons signalé

Tableau 8

Poids moléculaire (PM) et pH optimal d'activité de quelques enzymes extracellulaires de *P. noxius* partiellement purifiées.

ENZYMES	PM	pH optimal
a-galactosidase	112-115 000	5,0
b-galactosidase 1	74 000	4,3
b-galactosidase 2	43 000	4,3
b-glucosidase 1	69 000	5,0
b-glucosidase 2	88 000	5,0
CM-cellulase 1	33 000	4,8
CM-cellulase 2	31 000	4,8
Pectinase	39 000	4,5
Xylanase	38 000	3,8
Laccase	70 000	4,5
Peroxydase	47 000	4,0

précédemment, cette différence de potentialité est particulièrement évidente au niveau des polyosidases.

Concernant le complexe cellulolytique, les deux champignons excrètent les trois enzymes (exo-glucanase, endo-glucanase et cellobiase) nécessaires à la dégradation totale de la cellulose en son monomère, le glucose. D'après HIGHLEY (1977) un tel équipement est caractéristique d'un agent de pourriture blanche ; il constituerait donc un indice supplémentaire de l'appartenance de *P. noxius* à ce groupe de champignons et non à celui des agents de pourriture brune.

Les essais de purification des enzymes excrétées par *P. noxius* ont permis de recenser des isoenzymes (deux dans chaque cas) pour la b-glucosidase, la b-galactosidase et la CM-cellulase. Les deux b-glucosidases dégradent le cellobiose et sont donc susceptibles de participer à la phase ultime de la dégradation de la cellulose. Les deux CM-cellulases sont toutes les deux de type endo d'après les caractéristiques de l'hydrolyse de la CM-cellulose.

Comparé à celui d'autres champignons, l'équipement de *P. noxius* en enzymes cellulolytiques, notamment en endo-glucanase (CM-cellulase), paraît relativement simple. En effet *S. pulverulentum* excrète cinq endo-glucanases, une exoglucanase et deux b-glucosidases (cellobiase) (ERIKSSON, 1981a et b ; ERIKSSON et RZEDOWSKI, 1969 a et b ; ERIKSSON et PETERSON, 1975 a et ; ALMIN et al., 1975 ; BUCHT et ERIKSSON, 1969).

Pour leur part BELDMAN et al. (1985) ont isolé, à partir d'une préparation de cellulase commerciale de *Trichoderma viride*, six endoglucanases, trois exoglucanases et une b-glucosidase (cette dernière présente des caractéristiques tout à fait exceptionnelles puisqu'elle n'hydrolyse pas le cellobiose mais hydrolyse par contre, modérément, la CM-cellulose, l'Avicel et le xylane et très activement le p-nitrophényl-b-D-glucose et le p-nitrophényl-b-D-xylose). D'autres systèmes enzymatiques ont été décrits, notamment celui de *Trichoderma reesei* qui lui aussi est caractérisé par l'existence de plusieurs isoenzymes.

Cette multiplicité d'enzymes produites par un même organisme paraissait surprenante et l'on pouvait se demander s'il ne s'agissait pas d'artefacts.

De fait si les conditions de culture sont modifiées, *T. reesei* ne produit plus qu'une seule endoglucanase. D'après des essais complémentaires il ressort que la multiplicité des enzymes du filtrat de culture proviendrait de l'action d'enzymes protéolytiques sur une protéine enzymatique originelle unique. ERIKSSON (1981a) estime qu'un mécanisme de ce type pourrait également expliquer la présence des 5 endoglucanases (dont les PM sont peu différents les uns des autres) dans le filtrat de culture de *S. pulverulentum*, dans lequel des enzymes protéolytiques ont été caractérisées.

Tableau 9

Activités enzymatiques mises en évidence dans les filtrats de culture de *R. lignosus* et de *P. noxius*.

Acitivités enzymatiques	<i>R. lignosus</i>	<i>P. noxius</i>
Phosphatase acide	++	++
b-glucosidase (cellobiase)	+++	+++
a-galactosidase	+/-	++++
b-galactosidase	++	++
Enzymes pectiques:		
- PME	?	++
- Polygalacturonase	+	+++
- PGTE	?	+
Enzymes cellulolytiques:		
- CM-cellulase (endo-glucanase)	+	++++
- Exo-glucanase	+	++++
Xylanase	+	++++
b-(1-->3)-glucanase	+	++
Estérases	+	++
Protéase (leucyl-aminopeptidase)	+	-
Laccase	++++	+
Peroxydase	-	++
Catalase	+++	+

Chez *P. noxius* le nombre de CM-Cellulases peut également varier : lors de certaines expériences de purification une seule de ces enzymes a été détectée; enfin le PM de la CM-Cellulase 1 (33000 D) est très voisin de celui de l'enzyme 2 (31 000 D); en revanche nous n'avons jamais pu détecter d'enzyme protéolytique dans le filtrat de culture.

Enfin, concernant l'activité des exoglucanases, deux situations peuvent se présenter quant à la nature du produit d'hydrolyse de l'Avicel : cellobiose seul (cas des enzymes excrétées par *T. reesei* et des enzymes Exo II et Exo III de *T. viride*), cellobiose + glucose (cas de l'exoglucanase excrétée par *S. pulverulentum*). L'exoglucanase I de *T. viride*, pour sa part, catalyse la libération du cellobiose à partir de l'Avicel puis hydrolyse le cellobiose en glucose ; cette enzyme présente donc à la fois la caractéristique d'une exoglucanase et d'une cellobiase.

Dans le cas de *P. noxius* et *R. lignosus*, ces deux sucres sont identifiés dans le milieu réactionnel. Cependant ces essais ayant été réalisés à l'aide d'un filtrat brut, l'hydrolyse du cellobiose en glucose résulte à notre avis de l'activité de la cellobiase (b-glucosidase) présente dans ce milieu réactionnel. Seule la mise en oeuvre d'exoglucanase purifiée permettrait de vérifier si ces enzymes présentent également une activité cellobiase comparable à celle de l'exoglucanase I de *T. viride*.

III. LA DEGRADATION DE LA LIGNINE . ROLE DE LA LACCASE.

Les hypothèses que nous avons émises plus haut relatives à l'influence de la balance entre activités laccase et hydrolase sur le comportement parasitaire des deux agents pathogènes reposent sur l'hypothèse selon laquelle la laccase constitue un témoin fiable de l'aptitude des champignons à dégrader la lignine. Il était donc essentiel, dans l'optique de notre étude, de vérifier si la laccase intervient effectivement dans la dégradation de ce polymère.

D'entrée une première question peut être posée : pourquoi le choix s'est-il porté sur la laccase en tant que marqueur de la dégradation de la lignine plutôt que sur une autre enzyme ?

Le rôle privilégié des "phénoloxydases" dans la biodégradation de la lignine a été suggéré il y a plus de cinquante ans par BAVENDAMM (1928). Les travaux de cet auteur révélaient que les champignons agents de pourriture blanche du bois, dégradant la lignine, synthétisent et excrètent une phénoloxydase, tandis que les agents de pourriture brune (non lignivores) ne produisent pas cette enzyme. Depuis cette époque, de nombreuses recherches (HARKIN et OBST, 1973; HARKIN et al., 1974; KIRK et KELMAN, 1965; SUNDMAN et NÄSE, 1971; *inter alii*) ont été conduites, apportant une précision fondamentale, à savoir que la phénoloxydase spécifique des agents de pourriture blanche est une laccase (p-diphénoloxydase, E.C. 1.10.3.2).

Cette corrélation étroite entre capacité à excréter une laccase et aptitude à dégrader la lignine, soulevait la question de l'intervention effective de l'enzyme dans la dépolymérisation de la lignine. Cette question était d'autant plus pertinente que la dégradation du polymère, de structure polyphénolique complexe, fait appel à des réactions oxydatives. L'hypothèse d'une intervention de la laccase était donc parfaitement plausible, la très faible spécificité de substrat de cette enzyme la rendant, de plus, apte à oxyder les composés phénoliques les plus divers. Cependant, les très nombreuses investigations opérées dans ce domaine (voir notamment les revues de ANDER et ERIKSSON, 1978; ERIKSSON, 1981a et b; HALL, 1980; HIGHLEY et KIRK, 1979; KIRK, 1971; KIRK et al., 1977; LEVINE, 1966; MAYER et HAREL, 1979) ont conduit à des résultats contradictoires.

En effet, si, de façon générale, les différents auteurs admettent l'intervention de la laccase dans la biodégradation de la lignine comme une réalité, en revanche, leurs opinions divergent quant aux mécanismes impliqués. Pour certains, l'enzyme effectue (ou, du moins, est théoriquement capable d'effectuer) la rupture oxydative de la macromolécule (ISHIHARA, 1980; ISHIHARA et MIYAZAKI, 1972; IWAHARA et HIROSE, 1983; KIRK et al., 1968 a et b; UMEZAWA et al., 1982; Van VLIET, 1954). D'autres estiment qu'elle polymérise la lignine (HAARS et HÜTTERMANN, 1980 a et b; HÜTTERMANN et al., 1977; 1983); la

réalité de cette action étant mise en doute par KERN (1983). Pour leur part, ISHIHARA et MIYAZAKI (1972) montrent que l'enzyme effectue à la fois la condensation et la dépolymérisation de la macromolécule. Par contre ANDER et ERIKSSON (1976) estiment que la laccase joue un rôle majeur dans la régulation de la synthèse d'autres enzymes directement impliquées dans la dégradation du squelette lignocellulosique. D'autres auteurs pensent que la laccase intervient essentiellement pour détoxifier les milieux de culture (ou les tissus de l'hôte) par oxydation des composés phénoliques toxiques pour le champignon (GADD, 1957; GRABBE et al., 1968, GIERER et OPARA, 1973). Enfin, l'activité dépolymérisante de la laccase n'a pas été confirmée par KAPLAN (1979), qui, par ailleurs, n'a pas réussi à mettre en évidence une stricte corrélation entre présence de l'enzyme et aptitude des microorganismes à dégrader la lignine (KAPLAN et HARTENSTEIN, 1980).

Ce rapide survol de la littérature montre que le problème posé par la fonction de la laccase excrétée par les champignons lignivores est loin d'être clairement résolu.

Schématiquement on peut dire qu'il existe plusieurs écoles: l'une considère l'intervention directe de la laccase dans la biodégradation de la lignine comme une réalité, l'autre estime que cette enzyme effectue en fait la polymérisation de la lignine à partir des unités phénylpropanes ou de fragments de lignine de petite taille. De manière très générale la lecture des différentes publications traitant de ce sujet nous amène à formuler les remarques suivantes :

- De nombreux travaux sont effectués en ajoutant de la lignine, dont on suit le devenir, directement dans le milieu de culture du champignon. Comme le signalent LEONOWICZ et al. (1985), les résultats issus de telles expérimentations sont ambigües, la laccase n'étant pas nécessairement la seule enzyme à intervenir dans la transformation de la lignine ni surtout la seule à être excrétée par le champignon. Dans ces conditions il est toujours possible d'imaginer que les éventuels produits de dégradation subissent des transformations successives, rendant de ce fait même l'interprétation des résultats délicate.

- De nombreux travaux sont, également, réalisés en faisant agir la laccase purifiée sur des substrats-modèles en particulier des dimères. Ces essais sont extrêmement précieux car ils permettent de préciser les mécanismes enzymatiques impliqués. Cependant la capacité à effectuer la rupture d'un dimère ne signifie pas nécessairement que l'enzyme en question soit capable de dégrader le polymère.

C'est pourquoi, dans le cadre de la présente étude il nous paraissait essentiel de vérifier l'action d'une enzyme purifiée sur une lignine polymérisée.

Se posait dès lors le problème du choix du substrat : la lignine est en effet insoluble et de surcroît intimement liée, dans les parois végétales, à la cellulose, aux hémicelluloses et aux matières pectiques. Les seules équipes

ayant, à notre connaissance, adopté la même démarche ont utilisé, l'une (ISHIHARA et MIYAZAKI, 1972, 1980), la lignine de bois moulu extraite au dioxane, l'autre (KAPLAN, 1979) différentes lignines du commerce (lignine de Kraft, Induline, ligninosulfonate...) (une troisième équipe (LEONOWICZ et al., 1985) vient récemment de publier un travail similaire en utilisant également du ligninosulfonate (Peritan-Na) comme substrat); Le problème majeur est d'utiliser un polymère qui, après extraction à partir du bois, conserve les types d'enchaînement et la composition monomérique de la lignine naturelle. Vu la diversité des lignines dans le bois et leur hétérogénéité préexistante (MONTIES, 1980 ; MONTIES et LAPIERRE, 1982) on ne peut espérer obtenir, par quelque méthode d'extraction que ce soit, ni un produit homogène, ni vraisemblablement un produit représentatif des lignines natives, au moins au plan des proportions relatives.

La lignine de bois moulu est considérée par de nombreux spécialistes comme la plus proche de la lignine naturelle, encore que sa composition monomérique puisse différer du produit originel. Les ligninosulfonates et surtout diverses lignines du commerce, sous-produits de l'industrie papetière sont souvent des dérivés résultant d'une action chimique vigoureuse provoquant des modifications structurales importantes.

Pour notre part nous avons choisi comme substrat, une lignine extraite par l'acide thioglycolique, traitement considéré comme le plus doux parmi les méthodes d'extraction chimique, et respectant le mieux les liaisons intermonomériques (LAI et SARKANEN, 1971) ; le spectre UV (Fig. 31 A) de cette lignine thioglycolique (LTG) est en accord avec les données de la littérature (BRAUNS et BRAUNS, 1960 ; GOLDSCHMID, 1971). La LTG présente par ailleurs l'intérêt d'être hydrosoluble en milieu tamponné à pH 6.

L'enzyme utilisée pour cette expérimentation est la laccase L1 de *R. lignosus*. Il s'agit de l'enzyme majeure abondamment excrétée par ce champignon.

Au cours d'une première étape nous avons purifié cette enzyme tout en étudiant, parallèlement, les caractéristiques de la laccase L2 de *R. lignosus* ainsi que de celle excrétée par *P. noxius*. Ce faisant nous avons un double objectif :

- * d'une part, vérifier si les différentes enzymes citées sont bien des laccases, déterminer leurs principales propriétés et caractéristiques physicochimiques et les comparer à celles d'autres enzymes du même type synthétisées soit par des arbres, soit par des champignons (voir notamment les revues publiées par LEVINE, 1966 ; MAYER et HAREL, 1978)

- * d'autre part, purifier à homogénéité l'enzyme L1 dans le but d'étudier, au cours d'une seconde étape, son action sur la LTG.

Figure 24 - Séparation des laccases L1 et L2 par chromatographie sur DEAE-cellulose type DE52.

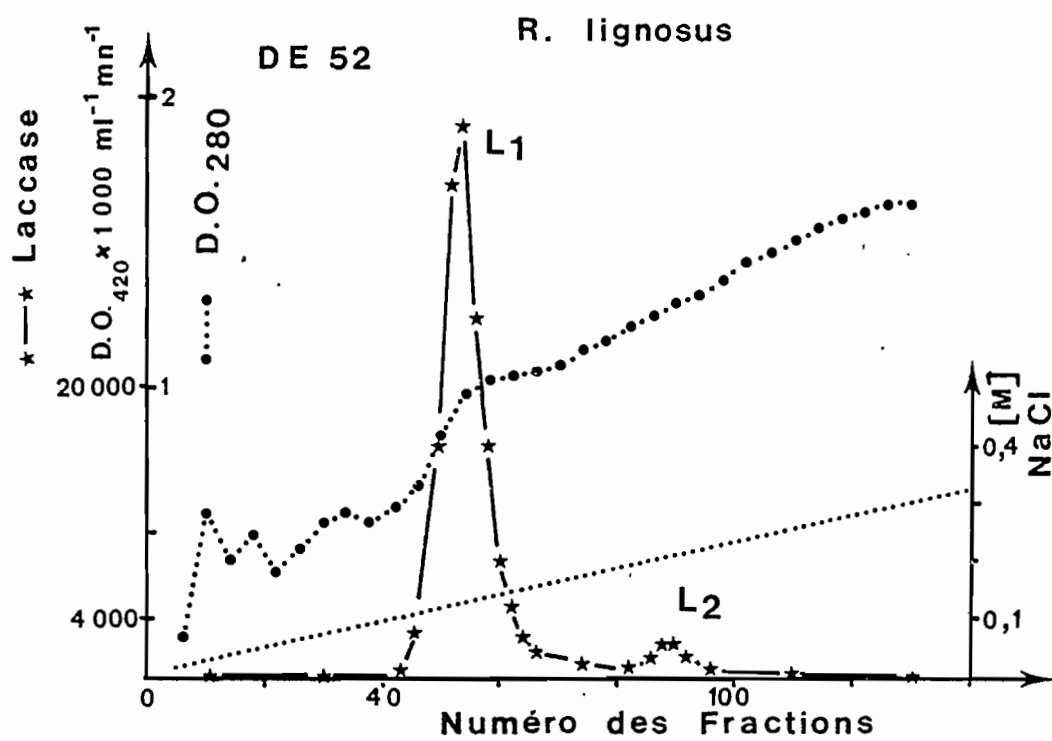
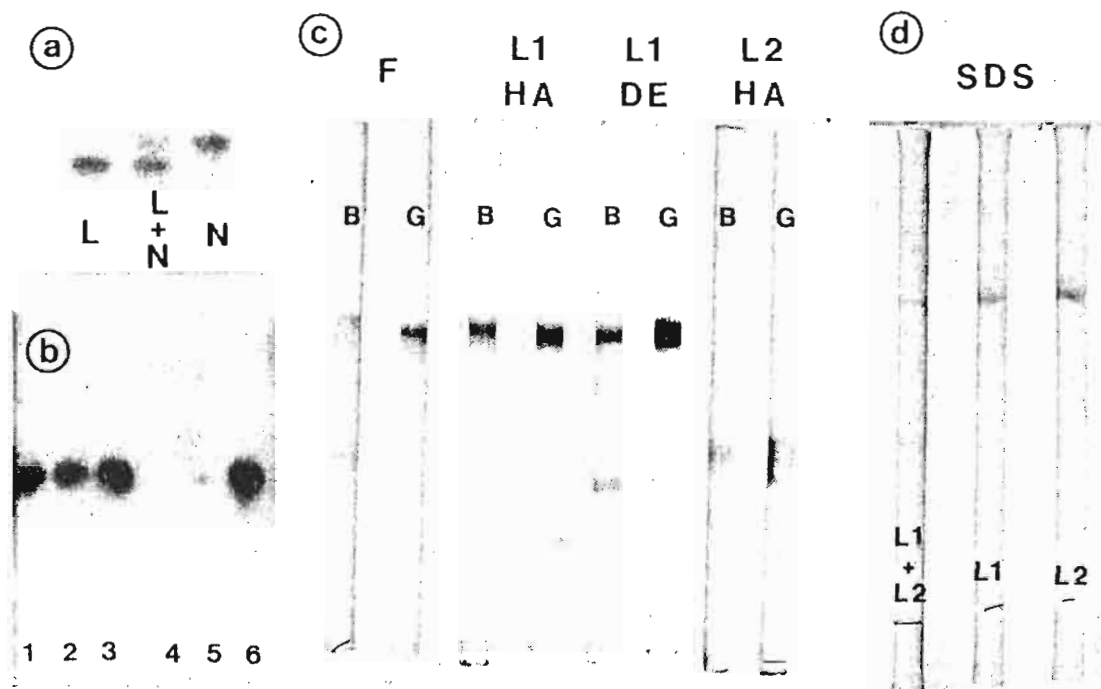


Figure 25- Contrôle des laccases de *R. lignosus* et *P. noxius* à différentes étapes de leur purification. (a et b: électrophorèse en gel d'amidon suivie de la révélation des laccases par leur activité catalytique; c et d: électrophorèse en gel de polyacrylamide).



a) Caractérisation des laccases L1 et L2 (*R. lignosus* (L)) et de l'enzyme de *P. noxius* (N); L+N = mélange des deux filtrats. **b)** Contrôle des différentes étapes de purification des laccases L1 et L2: 1, 2 et 3: différentes fractions de l'effluent de la colonne d'hydroxyapatite (laccase L1); 4: éluat de la colonne hydroxyapatite (laccase L2); 5 et 6: éluat DE52: respectivement: fraction L2 (encore contaminée par l'enzyme L1) et L1. **c)** F = filtrat de culture; L1 et L2 HA = laccase L1 et L2 après purification sur hydroxyapatite; L1 DE = laccase L1 après l'étape DE52; B et G = respectivement révélation au bleu de coomassie (protéine) et au gaiacol (activité laccase). **d)** Electrophorèse en gel SDS à l'issue de la purification.

1. PURIFICATION DES LACCASES DE *R. LIGNOSUS* ET DE *P. NOXIUS*.

a) Identification des enzymes dans les filtrats de culture (rappel)

Par électrophorèse en gel d'amidon, suivi d'une incubation dans le milieu réactionnel des laccases, il est possible de révéler deux enzymes (L1 et L2) dans le filtrat de culture de *R. lignosus* et une (LN) dans celui de *P. noxius* (Fig. 25a). Dans ce dernier cas, une incubation de longue durée permet de révéler deux bandes supplémentaires de faible intensité. L'étude qui suit ne prend en compte que les enzymes majeures L1, L2 et LN.

b) Purification des laccases excrétées par *R. lignosus*.

La purification de ces enzymes est réalisée en trois étapes résumées dans le tableau 10

Le filtrat brut ayant une pigmentation brune relativement intense, les mesures de DO n'ont pas été mentionnées à ce stade. Elles n'ont en effet aucune signification quant au contenu réel en protéines de cette solution. Il en est de même au stade "batch DE 52", bien que cette étape permette d'éliminer une partie importante de la pigmentation d'origine, vraisemblablement à la présence de composés phénoliques oxydés, de taille inférieure à 10 000 D puisqu'ils traversent la membrane du filtre Amicon PM 10. Ainsi le degré de purification apparent des fractions L1 et L2, séparées par chromatographie sur DEAE-cellulose (Fig. 24) est grandement amélioré par simple concentration et lavage des solutions sur l'ultrafiltre (Tabl. 10).

Le passage sur colonne d'hydroxyapatite a pour but principal de débarrasser la fraction L2 de la laccase L1 qui la contamine. L'examen des plaques d'électrophorèse (Fig. 25 b) révèle en effet l'importance de cette contamination. En première approximation, elle représente plus de la moitié de l'activité enzymatique totale de la solution "L2 - DE52". Après élution, l'enzyme L2 est pure.

Cette même procédure permet d'achever la purification de la laccase L1 qui, dans les conditions opératoires utilisées, n'est pas adsorbée sur l'hydroxyapatite. Les fractions recueillies ne contiennent plus le contaminant protéique présent au stade DE 52 (Fig. 25 c; gel "L1DE" et "L1HA").

TABLEAU 10

Purification des laccases de *R. lignosus*

Etapes	Volumes (ml)	<u>D.O. 280</u> D.O. 260	Proteines totales (mg)	Activité totale (U)	Activité spécifique (U/mg)	Rendement
Filtrat	7 050	-	-	6 850 000	-	100
Batch DE52	66	-	-	3 575 000	-	52
DE 52						
a) fractions non concentrées						
L 1	225	1,04	229,5	1 968 600	8 750)	34
L 2	175	0,97	296	361 300	1 220)	
b) fractions concentrées (Amicon PM10)						
L 1	17,2	1,27	60,5	1 892 200	31 270)	33,4
L 2	12	1,05	42,9	394 800	9 200)	
Hydroxy-apatite (fractions concentrées)						
L 1	10	1,4	35,2	1 472 500	41 830)	22
L 2	7	1,12	5,0	37 500	9 000)	

La figure 25 c présente les résultats de certaines de ces étapes de purification en mettant en parallèle des électrophorégrammes révélés soit par le Bleu de Coomassie (coloration des protéines), soit par le gaïacol (activité laccase). Enfin, la figure 25 d rend compte de l'homogénéité des protéines après électrophorèse en conditions dénaturantes (SDS).

c) Purification de la laccase de *P. noxius*

La purification de cette enzyme a été moins poussée que celle des deux laccases de *R. lignosus*. Notre objectif se limitait, en effet, à l'obtention d'une

Figure 26 - Purification partielle de la laccase de *P. noxius*: **A)** Profil d'élution de différentes enzymes par Chromatographie sur DEAE-cellulose. **B)** Rechromatographie sur Sephadex G75, de la fraction enrichie en laccase au cours de l'étape **A)**.

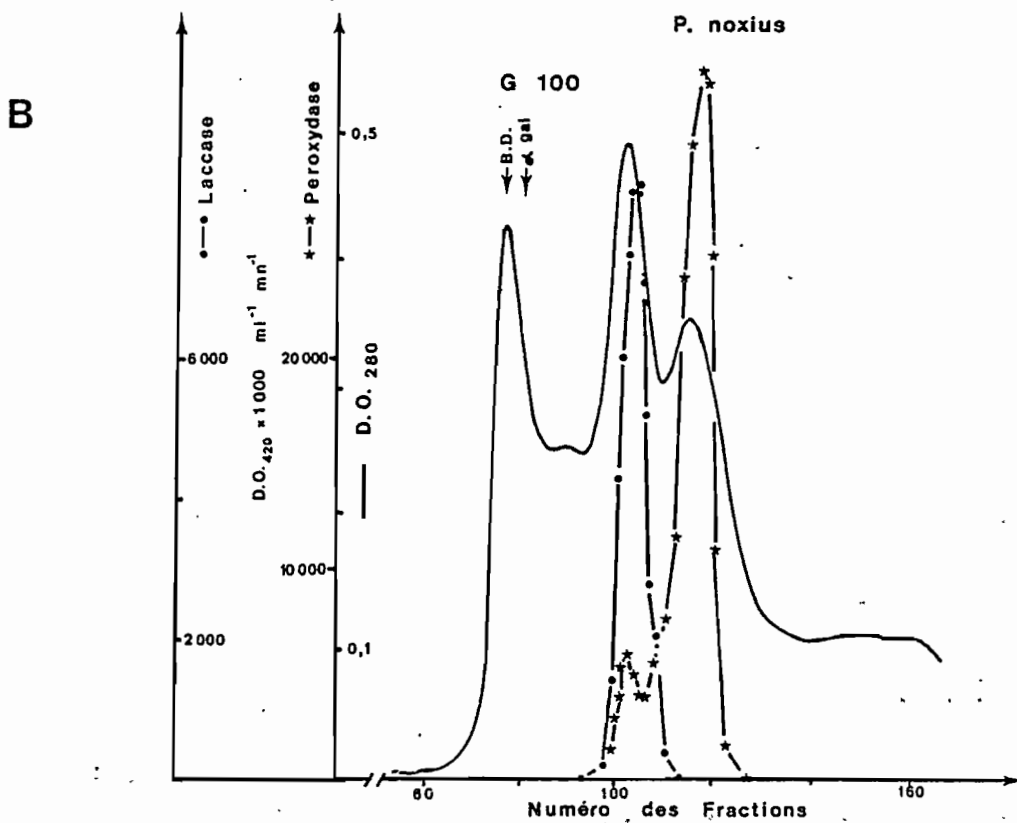
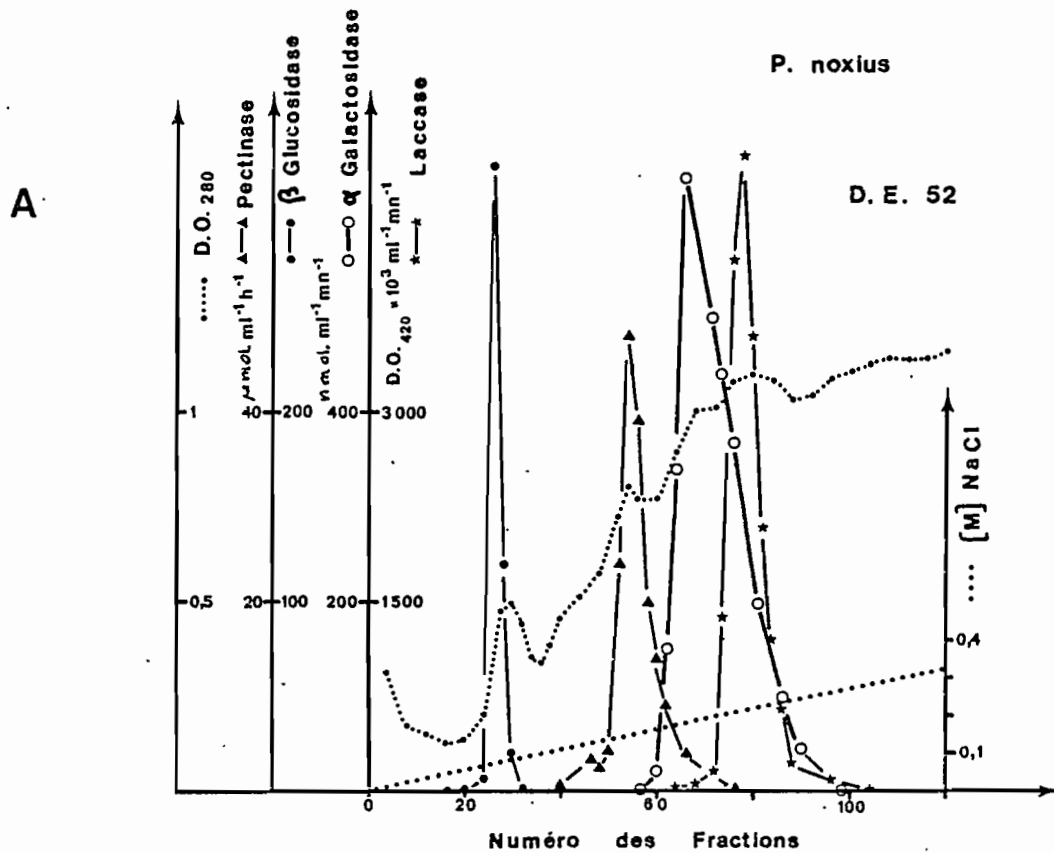


Figure 27 - Caractéristiques spectrales de la laccase L1 de *R. lignosus*(A) et de la laccase de *P. noxius*(B).

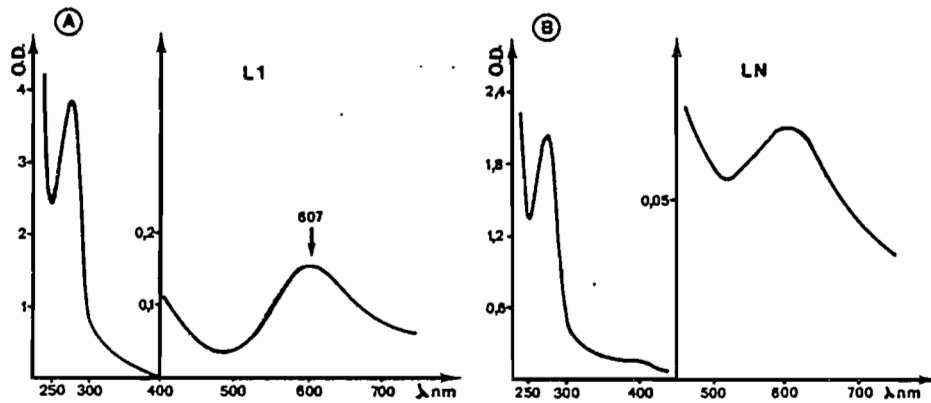
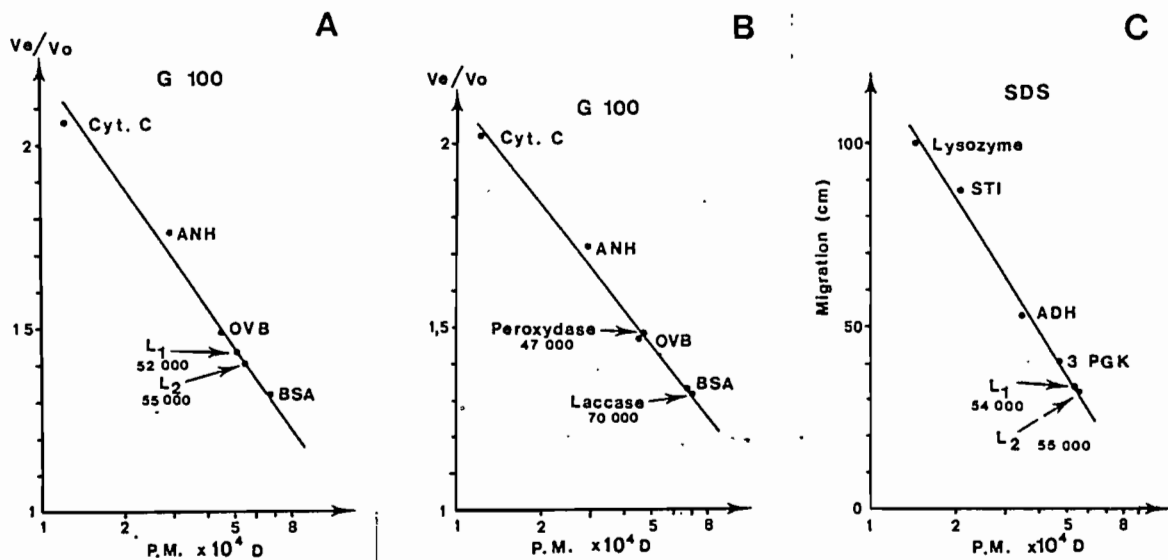


Figure 28- Détermination graphique du PM des différentes laccases: **A)** L1 et L2 de *R. lignosus* détermination effectuée par filtration sur gel de Sephadex en conditions non dénaturantes; **B)** Laccase (et peroxydase) de *P. noxius* (mêmes conditions qu'en A); **C)** Laccases L1 et L2 de *R. lignosus* détermination effectuée en conditions dénaturantes (gel de polyacrylamide + SDS).



laccase suffisamment concentrée et débarrassée de la pigmentation brune du filtrat de culture de manière à convenir à la détermination de certaines caractéristiques physicochimiques (notamment spectrales).

Les premières étapes de purification (adsorption sur DEAE-cellulose suivie d'une élution par une solution de force ionique élevée et d'une concentration sur ultrafiltre Amicon PM10), sont identiques à celles décrites plus haut. Cette solution concentrée est très riche en glycosidases et polyosidases. Afin de les séparer de la laccase, la solution est chromatographiée sur colonne de DE 52 (Fig. 26 A). Les fractions enrichies en laccase sont récoltées et concentrées. Elles contiennent encore une quantité appréciable d' α -galactosidase et, surtout, de peroxydase. Ces contaminants sont éliminés par filtration sur colonne de gel de Sephadex G100 (Fig. 26 B). Les fractions les plus actives sont rassemblées et concentrées; la solution obtenue présente la coloration bleue caractéristique des laccases. Elle conserve néanmoins une faible activité peroxydasique (légère absorption à 402 nm. cf Fig. 27 B).

d) Propriétés physicochimiques

1° Caractéristiques spectrales

Les spectres des laccases L1 (Fig. 27 A) et LN (Fig. 27 B) purifiées ont été enregistrés pour des longueurs d'onde comprises entre 750 et 240 nm. Ils présentent, outre le pic d'absorption des protéines à 280 nm, un deuxième pic vers 605 nm. Ce dernier est caractéristique des enzymes à cuivre (Cu^{2+}) et responsable de la coloration bleue des solutions concentrées de laccase. L'enzyme L2 possède les mêmes caractéristiques spectrales.

2° Spécificité de substrat

Les résultats des tests de spécificité de substrats (Tableau 11) confirment l'appartenance des trois enzymes au groupe des laccases. Elles oxydent en effet l'hydroquinone et la syringaldazine (HARKIM et OBST, 1973), substrats spécifiques des p-diphénoloxydases, mais non la tyrosine, substrat-type des polyphénoloxydases (o-diphénoloxydases).

Outre ces trois substrats, divers composés phénoliques choisis, pour la plupart, pour leur relation avec le métabolisme de la lignine ont été testés. Dans les conditions indiquées et bien qu'elles ne soient pas nécessairement optimales pour tous les substrats, un certain nombre de tendances significatives se dégagent des résultats enregistrés.

TABLEAU 11

Spécificité de substrat des laccases purifiées

Substrat	Concentration (M/ml)	Activité relative		
		L 1	L 2	LN
Hydroquinone	1,8	100	100	100
Gaiacol	1,8	80	87	105
Syringaldazine *	$1,2 \cdot 10^{-4}$	12,5	5,3	12
Tyrosine	1,8	0	0	0
p-hydroxybenzaldéhyde		12	5	14
Ac. p-hydroxybenzoïque		22	0	14
Ac. o-coumarique	1,8	45	28	17
Ac. m-coumarique	1,8	6	7	7
Ac. p-coumarique	1,8	80	56	50
Ac. caféique	1,8	190	228	374
Ac. férulique	1,8	190	244	309
Al. coniférylique	1,8	165	215	310
Ac. sinapique	1,7	3 600	280	400
T.G.L.	(0,2 %)	148	109	171

* très peu soluble dans l'eau

Milieux réactionnels: 3ml contenant chaque substrat à la concentration indiquée dans un tampon acétate 0,05 M, pH 5 pour LN (2400 U/ essai) et pH 6 pour L 1 (7350 U/ essai) et L 2 (1070 U/ essai)

Outre ces trois substrats, divers composés phénoliques choisis, pour la plupart, pour leur relation avec le métabolisme de la lignine ont été testés. Dans les conditions indiquées et bien qu'elles ne soient pas nécessairement optimales pour tous les substrats, un certain nombre de tendances significatives se dégagent des résultats enregistrés.

De manière générale les composés de la série cinnamique sont oxydés plus rapidement que les composés correspondants de la série benzoïque (acide p-coumarique > acide p-hydroxybenzoïque = p-hydroxybenzaldéhyde). Concernant la série cinnamique, cette vitesse d'oxydation croît selon la séquence acide p-coumarique --> acide férulique --> acide sinapique. La méthylation de l'hydroxyle en C3 et la réduction de la fonction acide carboxylique en fonction alcool (en C.. de la chaîne latérale) n'a que peu d'effet sur l'activité enzymatique

(efficacité comparable des acide caféique et férulique et de l'alcool coniférylique). Par contre la position de l'hydroxyle phénolique libre paraît fondamentale: la position en "para" étant la plus favorable. Enfin la lignine thioglycolique, est également un substrat des laccases étudiées.

En définitive, les trois enzymes présentent des caractéristiques de spécificité de substrat très voisines.

La liste des substrats présentée ici est loin d'être exhaustive. Des tests qualitatifs effectués précédemment à l'aide d'un filtrat de culture de *R. lignosus* avaient permis d'identifier une trentaine de substrats phénoliques. Il est à noter que l'oxydation enzymatique du p-crésol conduit à la formation d'un précipité blanc, tout comme celle de l'alcool coniférylique.

Enfin, comme déjà signalé (BOCKS, 1967), l'utilisation d'un substrat légèrement oxydé, augmente considérablement la vitesse de la réaction enzymatique et supprime la phase d'"accélération" observée durant les premières secondes de la réaction. C'est pourquoi les activités spécifiques sont toujours mesurées à l'aide d'un milieu réactionnel préparé extemporanément.

3° Poids moléculaire

La détermination du poids moléculaire des enzymes natives, réalisée par filtration sur colonne de gel de Sephadex en présence des marqueurs protéiques cités conduit aux valeurs suivantes: 52 000 et 55 000 D respectivement pour les laccases L1 et L2 de *R. lignosus* (Fig. 28 A) et 70 000 D pour celle (LN) de *P. noxius* (Fig. 28 B).

La différence de PM entre L1 et L2 est faible mais paraît néanmoins significative puisque les valeurs fournies résultent d'une expérience de cochromatographie. Il convient de souligner qu'il s'agit de données relatives à des PM apparents.

En conditions dénaturantes (SDS) les valeurs de PM suivantes ont été déterminées : 54 000 (L1) et 55 000 (L2) (expériences individuelles; Fig. 28 C), alors qu'une coélectrophorèse effectuée dans les mêmes conditions ne permet de révéler qu'une seule bande protéique. Il faut en conclure que les laccases L1 et L2 sont constituées d'une seule chaîne peptidique de PM très voisin.

4° pH optimal d'activité et pH isoélectrique

Utilisant le gaïacol comme substrat, l'activité catalytique est optimale aux pH 5,6; 6,0 et 4,0 respectivement pour les laccases L1, L2 et LN. Il est à noter que le pH optimal d'activité peut varier suivant la nature du substrat (KUMARI et SIRSI, 1972).

La détermination du pH isoélectrique n'a été effectuée que pour les laccases excrétées par *R. lignosus*. les valeurs enregistrées sont: 3,83 pour la L1 et 3,32 pour la L2. Les différences de migration électrophorétique et de comportement en chromatographie sur DEAE-cellulose des deux protéines natives résultent vraisemblablement de cette différence de pHi.

e) DISCUSSION

L'objet de la première partie de cette étude était de purifier les laccases excrétées par *R. lignosus* et *P. noxius* et d'en déterminer quelques caractéristiques physicochimiques (Tableau 12). Les techniques utilisées sont celles communément mises en oeuvre pour la purification des protéines. Sur DEAE-Cellulose, les laccases L1 et L2 adoptent un comportement similaire respectivement aux laccases B et A purifiées par MOSBACH (1963), puis par FAHRAEUS et REINHAMAR (1967) à partir de filtrats de culture de *Polyporus versicolor*

TABLEAU 12

Principales caractéristiques physicochimiques des laccases

	L 1	L 2	LN
PM protéines			
* natives	52 000	55 000	70 000
* dénaturées	53 000	54 000	-
pH optimum (gaïacol)	5,6	6,0	4,6
pHi	3,82	3,32	-
Inhibition KCN 10 ⁻⁴ M (%)	66	73	87
<u>D.O.280</u>	24,6	-	29
D.O.605			
Activité spécifique (gaïacol pH 6)	41 800	9 000	5 300

A l'issue de la dernière étape de purification, nous obtenons généralement des laccases L1 et L2 pures, les deux protéines apparaissant homogènes en électrophorèse. Cependant, dans certains cas, on peut distinguer, après électrophorèse en gel de polyacrylamide, en conditions non dénaturantes, deux

bandes satellites de faible intensité, très voisines de la bande L1, donnant une réaction positive avec le gaïacol. Par électrofocalisation en veine liquide mettant en oeuvre un gradient de pH de très faible pente (pH 2,5 - 4,0), l'une de ces protéines satellite (pHi 3,80) a pu être séparée de l'enzyme majeure (pHi 3,83). Ces formes mineures n'apparaissent pas après électrophorèse en conditions dénaturantes ce qui implique qu'elles ont le même PM que la forme majeure. Les bandes mineures résultent-elles d'une dégradation ménagée de la protéine L1 originelle ? La présence dans le filtrat de culture de *R. lignosus* d'une protéase relativement active pourrait conforter une telle hypothèse.

L'existence de formes multiples de la laccase a déjà été évoquée. Ainsi EVANS et PALMER (1983) ont séparé la laccase B de *Coriolus versicolor* en 5 fractions dont le pHi varie entre 4,5 et 6,5 tandis que la laccase A était séparée en 2 fractions seulement (il s'agit des laccases A et B antérieurement considérées comme homogènes).

Il est à noter que lors de contrôles de pureté des enzymes L1 et L2 par électrofocalisation en gel de polyacrylamide (et seulement dans ces conditions) nous avons observé la formation de multiples bandes protéiques, conservant leur activité laccase, et caractérisées par des pHi variés (entre 3 et 6) très différents les uns des autres. Un tel résultat obtenu à partir d'enzymes purifiées, homogènes à l'électrophorèse classique ou en SDS paraissait extrêmement surprenant. En effet ces différences notables de pHi pour des protéines de même PM auraient dû conduire à des différences nettes de migration en électrophorèse et d'élution sur DEAE-Cellulose, différences qui sont d'ailleurs observées entre laccases L1 et L2. Des essais complémentaires ont montré que cette séparation en multiples fractions n'apparaissait plus en électrofocalisation lorsque les gels avaient préalablement été soumis à l'action d'un champ électrique (150 V, 30 minutes). Ceci tend à prouver que la structure moléculaire des laccases L1 et L2 est relativement fragile, en tout cas sensible à l'un des composés chimiques contenus dans le gel (peut-être le persulfate?). Suite à cette expérience toute électrophorèse en gel de polyacrylamide a toujours été précédée d'une pré-électrophorèse "à vide" (pre-run).

Comme déjà signalé, la différence entre L1 et L2 repose apparemment surtout sur leur pHi respectif. On peut donc estimer que les protéines diffèrent par leur structure primaire. Cependant, la constance, dans les filtrats de culture, des proportions relatives entre L1 et L2 conduit à penser qu'il existe un "lien" entre ces deux enzymes: leur synthèse est-elle sous le contrôle d'un même gène régulateur ou bien dérivent-elles l'une de l'autre par modification de la structure de la protéine, ou bien à la suite de l'action ménagée d'une protéase ou d'une glycosidase, enzymes présentes dans le filtrat de culture? L'analyse de la composition en amino-acides des deux protéines enzymatiques pourrait fournir une première réponse à ces questions.

Les enzymes L1, L2 et LN sont bien des laccases ainsi qu'en témoignent leurs caractéristiques spectrales (pic d'absorption à 605-610 nm et couleur bleue des solutions purifiées) et leur spécificité de substrat. Comme signalé par d'autres auteurs (LEVINE : 1966, DUBERNET et al., 1977, SCHANEL et al., 1971) cette dernière est exceptionnellement large (ortho-, meta-, para-diphénols, monophénols, composés phénoliques diversement substitués, lignine thioglycolique...).

Le PM des enzymes: environ 54 000 D pour la L1 et la L2 et 70 000 D pour la LN se situe dans une zone de valeurs correspondant fréquemment à celle des laccases d'autres champignons (MAYER et al., 1979). Seule l'enzyme 1 de *Podospora anserina* avec un PM de 390 000 D semble faire exception, encore serait-elle formée de 4 sous-unités d'environ 97 500 D chacune (MOLITORIS et ESSER, 1970, MINUTH et al., 1978). Les laccases L1 et L2 de *R. lignosus* ne sont pas constituées de plusieurs sous-unités protéiques.

Les données enregistrées quant au pH optimum d'activité des enzymes et à leur pHi sont elles aussi tout à fait classiques pour des laccases d'origine fongique. Celles-ci diffèrent sensiblement des valeurs déterminées pour des enzymes extraites de végétaux tels que *Rhus vernicifera* (REINHAMAR, 1970).

Enfin, dans un cadre plus général, rappelons que les laccases ont fait l'objet d'investigations nombreuses et diversifiées (LEVINE, 1966; MAYER et al., 1979). Outre les mises au point de techniques de purification et la détermination de propriétés physico-chimiques dont nous venons de parler, ces études ont trait à la stimulation de l'excrétion enzymatique par différents phénols (LEONOWICZ et TROJANOWSKI, 1975 a et b; FAHRAEUS et LINDEBERG, 1953; HAARS et al., 1981 HAARS et HÜTTERMANN, 1983), aux différentes formes de cuivre lié à la protéine et à leur rôle dans la catalyse enzymatique (MALKIN et al., 1979 a et b; ANDREASSON et al., 1976 a et b), enfin à l'intérêt des laccases comme caractère chimiotaxonomique (ROSCH et al., 1971, JOEL et al., 1978).

2. EFFET DE LA LACCASE L1 DE *R. LIGNOSUS* SUR LA LIGNINE THIOGLYCOLIQUE.

L'objectif de cette étude est de vérifier si la laccase est capable de dégrader la lignine ou au moins de participer à la dégradation de ce polymère. Nous n'aborderons donc ici aucun des problèmes liés à l'étude des mécanismes chimiques mis en jeu ni même à l'identification formelle des produits de réaction. Le seul résultat qui nous intéresse ici est le suivant : quel est l'effet de l'action de la laccase sur la LTG utilisée comme substrat

a) Matériel et méthodes

1° Enzyme, substrat, milieu réactionnel.

L'enzyme mise en oeuvre est la laccase L1 purifiée selon les indications fournies plus haut. Le substrat est une LTG préparée selon les techniques décrites précédemment. La densité optique à 280 nm d'une solution de TGL à 1% dans le tampon phosphate 0,05 M à pH 6 est égale à 76,2 unités. Cependant, pour plus de commodité, nous exprimons les quantités de TGL en équivalents DO_{280} calculés de la manière suivante:

$$\text{Nb total de } DO_{280} = DO_{280} \text{ de la solution} \times \text{Vol. (ml) de cette solution}$$

La réaction enzymatique est menée à température ambiante (26°C) sur une solution de LTG en tampon phosphate 0,05M à pH 6,0 (voisin du pH optimum (6,2) de l'activité catalytique), en présence de laccase. Les quantités de LTG et d'enzyme variant d'une expérimentation à l'autre, elles seront indiquées dans la légende des figures concernées. Le temps d'incubation varie de quelques heures à plusieurs jours. Pour éviter le développement éventuel de microorganismes dans le milieu réactionnel, celui-ci est stérilisé par passage au travers d'un filtre millipore 0,42 micron. Le témoin est réalisé dans les mêmes conditions en mettant en oeuvre une laccase préalablement thermoinactivée.

2° Analyse des produits de réaction.

* Estimation de la masse moléculaire

Les modifications de Poids Moléculaire (PM) sont évaluées par filtration sur colonne de gel de Sephadex G100, G50 ou G25 (d: 1,8 cm; h: 100 cm) équilibré dans le tampon phosphate de sodium 0,05M à pH 6,0. La LTG et les produits de réaction sont élués à l'aide de ce même tampon (débit variable suivant la nature du gel); l'éluat est recueilli par fraction de 1,2 ml; la DO_{280} de l'éluat est

Figure 29 - Diagramme d'élution, sur gel de Sephadex G100, d'une solution brute de LTG. (Les valeurs du rapport V_e/V_0 sont indiquées au-dessus des flèches. Pourcentage de matériel recueilli dans chaque fraction: F1: 8,2%; F2: 22,7%; F3: 22,3%; F4: 31,4%; F5: 14,9%. PM des protéines marqueurs: voir "matériel et méthodes. Toutes les chromatographies de LTG sur gel de Sephadex sont réalisées en tampon phosphate de sodium 0,05M à pH 6).

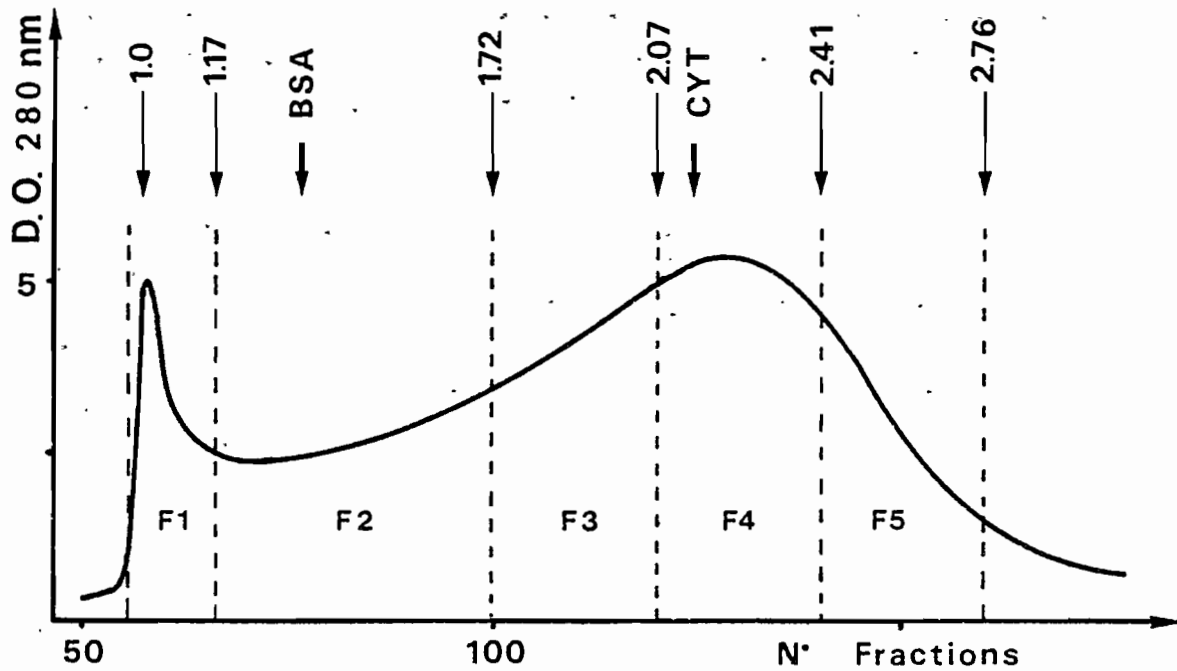
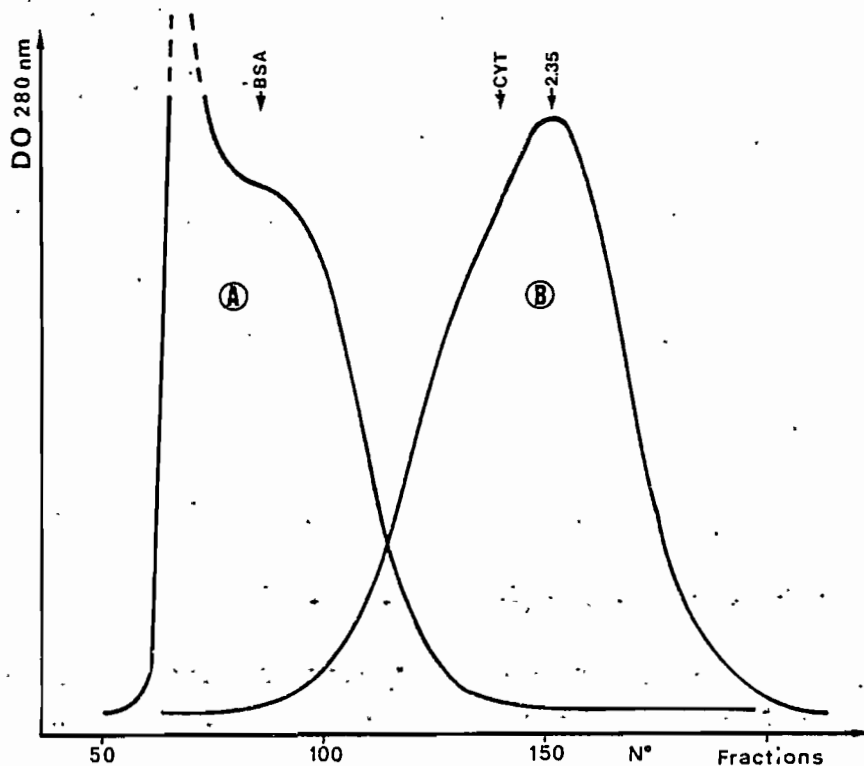


Figure 30 - Chromatographie sur colonne de Sephadex G100, de deux fraction A (PM > 10 000D) et B (PM < 10 000D) obtenues par fractionnement d'une solution de LTG brute sur ultrafiltre AMICON PM10.



enregistrée en continu (appareil Uvicord II, LKB). Le PM apparent de la LTG contenue dans les différents pics est évalué par référence à celui de protéines de PM connu servant à étalonner les colonnes. La position relative des différents pics sur l'élutogramme suffirait à elle seule à classer les molécules d'après leur taille. Cependant, pour plus de précision certaines fractions sont caractérisées par le rapport V_e/V_0 (V_e : volume d'élution de la fraction; V_0 : volume mort de la colonne). Nous examinerons plus loin la validité et la reproductibilité de cette technique.

Les molécules de LTG peuvent également être séparées en deux classes suivant la méthode de SUNDMAN (SUNDMAN et SELIN, 1970; SELIN et SUNDMAN, 1971), par filtration des solutions sur un ultrafiltre. Au cours de nos essais nous avons utilisé une membrane AMICON PM10 permettant d'isoler deux classes de molécules: une fraction A, retenue sur le filtre regroupe les polymères de PM supérieur à 10 000 D, et une fraction B, recueillie dans le filtrat, composée de molécules de masse inférieure à 10 000 D. Au plan pratique les filtrations sont réalisées dans les conditions suivantes: la solution à fractionner est versée dans la cellule de concentration et filtrée sous une pression d'azote d'environ 2kg/cm^2 (30 psi) jusqu'à réduction du volume à 1 à 2 ml. On rajoute alors dans la cellule 50 ml de tampon phosphate 0,05M, pH6 et on procède à une nouvelle concentration. Ce processus est renouvelé (6 à 8 fois) tant que le filtrat contient plus de 0,5% de la LTG initialement déposée dans la cellule.

* Analyse spectrale

L'analyse spectrale est effectuée sur les substrats et les produits de réaction par enregistrement du spectre entre 240 et 450 nm. Ces mesures sont faites d'une part sur des solutions à pH6 et d'autre part sur des solutions, de même concentration en LTG, portées à pH12 par addition de soude concentrée. Les informations les plus significatives sont cependant fournies par l'enregistrement du spectre différentiel d'ionisation, la solution basique étant "lue" contre la solution à pH6.

L'analyse spectrale a été systématiquement mise en oeuvre afin d'appréhender les modifications provoquées par l'oxydation enzymatique du substrat.

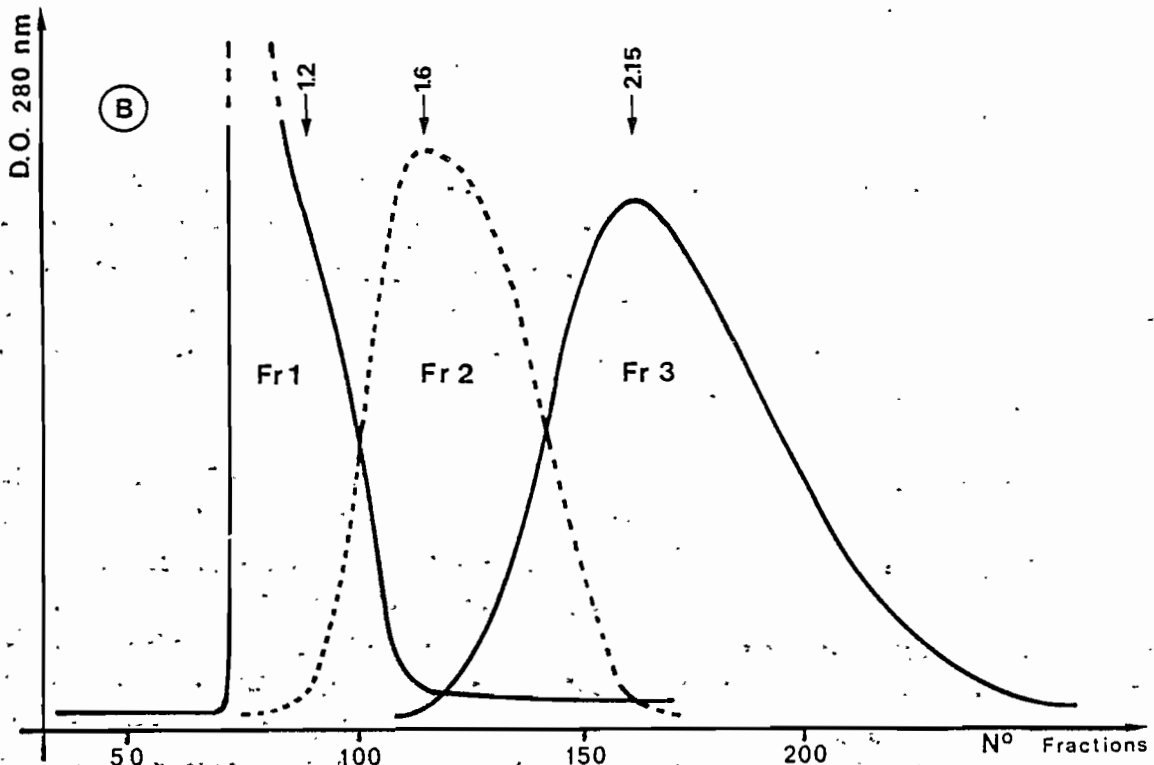
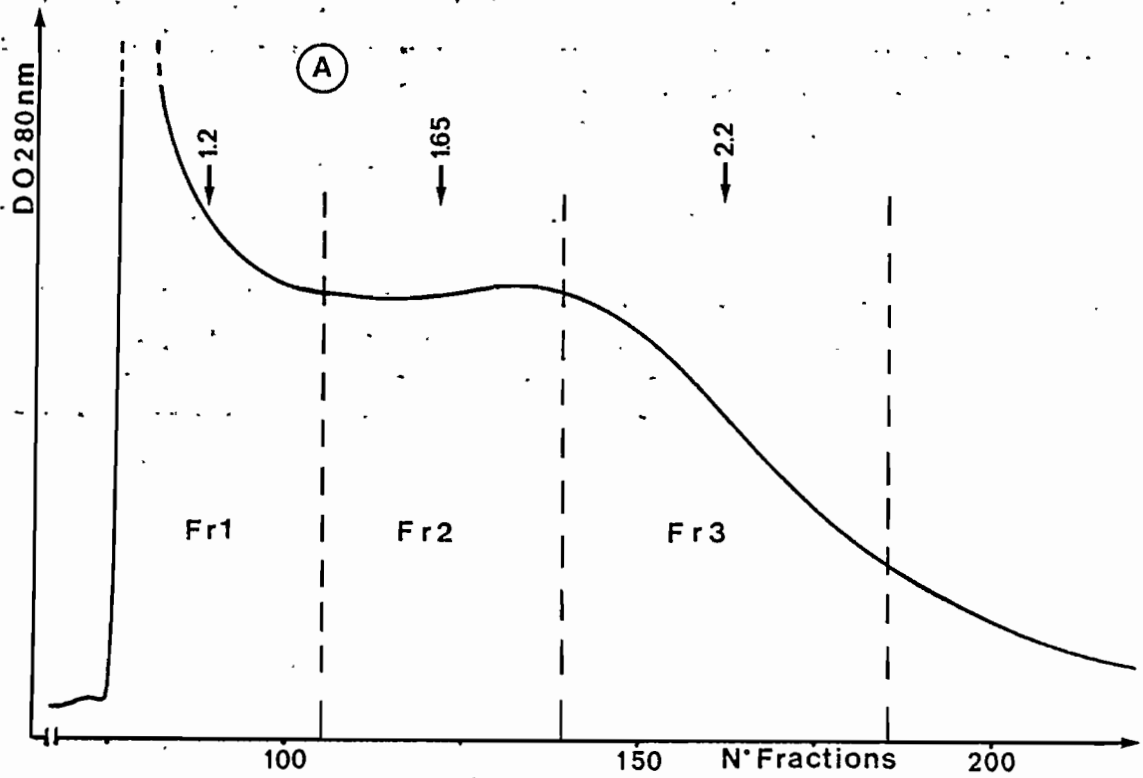
b) RESULTATS

1° Validité de la technique de fractionnement sur gel de Sephadex

* Distribution des molécules de LTG dans l'éluat

La filtration, sur gel de Sephadex G100, d'une solution de LTG, révèle la très grande hétérogénéité de ce substrat au plan du PM des molécules qui le

Figure 31 - Reproductibilité de la technique de filtration sur gel de Sephadex:
A) Diagramme d'éluion, sur Sephadex G50, d'une LTG brute: zone de récolte des fractions Fr1, Fr2 et Fr3. **B)** Diagrammes d'éluion (regroupés sur la même figure) résultant de la rechromatographie successivement des fractions Fr1, Fr2 et Fr3 sur la même colonne et dans des conditions identiques.



composent (Fig. 29). En effet, une première classe de molécules est éluée avec le volume-mort de la colonne, tandis qu'une seconde s'étend de manière continue entre des valeurs de PM apparents allant de 50 000 à 3 000 D, avec un pic centré vers 10 000 D. Ces valeurs de PM ne sont qu'indicatives, le comportement chromatographique des macromolécules de nature aromatique n'étant pas nécessairement comparable à celui des protéines ayant servi à étalonner la colonne. L'allure générale du diagramme d'éluion correspond à celle décrite par HÜTTERMANN (1977) pour la répartition des molécules de lignosulfonate. Cependant, alors que dans ce dernier cas le pic "haut PM" représente plus de 50% du matériel chromatographié, dans le cas présent cette fraction en contient à peine 8%.

Afin de vérifier si cette répartition repose effectivement sur des différences de masse molaire et n'est pas perturbée par des phénomènes d'adsorption secondaire des molécules sur le gel (ADLER et al., 1966), nous avons procédé au contrôle suivant: la solution brute de LTG est, dans un premier temps fractionnée sur ultrafiltre PM10, les fractions qui en résultent (A: PM > 10 000 D et B: PM < 10 000 D) sont ensuite chromatographiées séparément, mais dans des conditions identiques, sur gel de Sephadex G100.

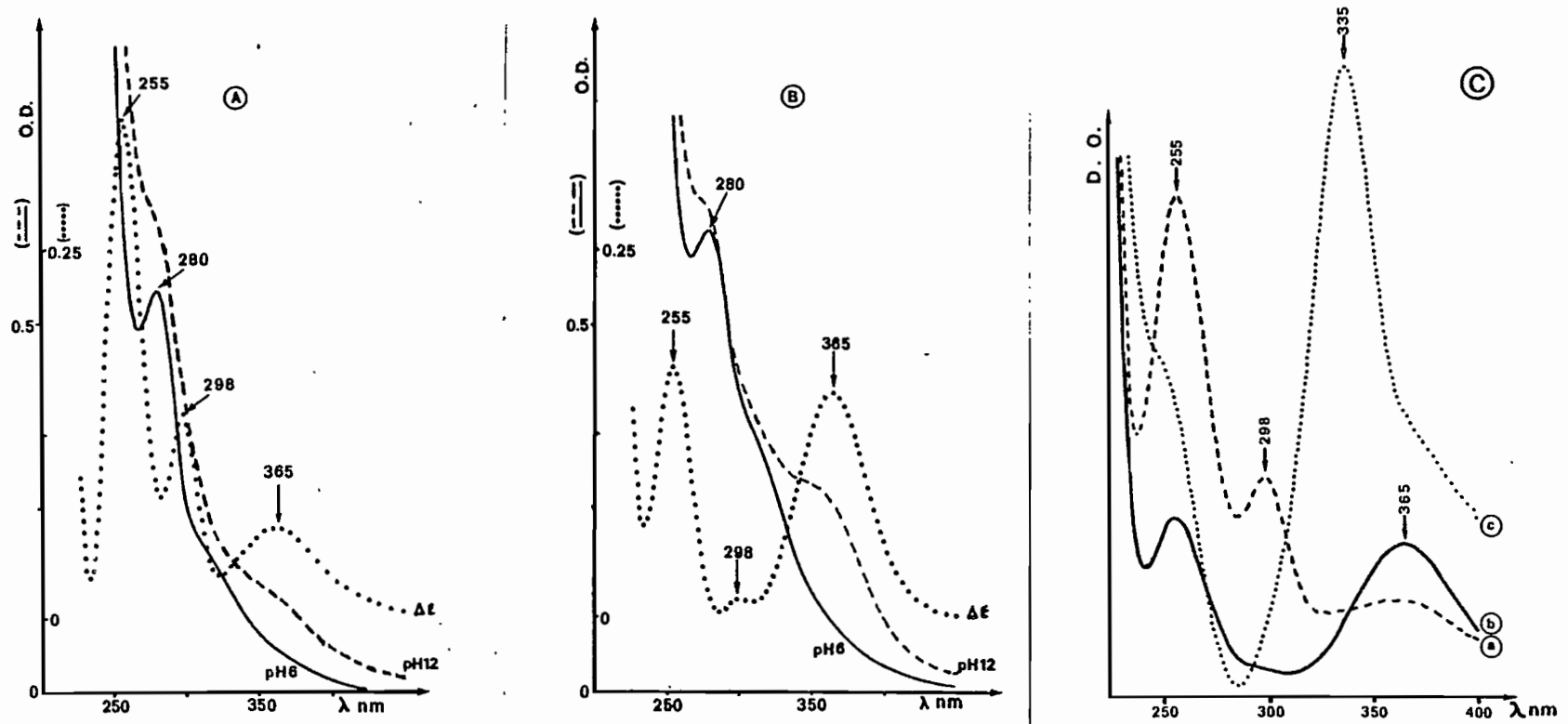
La figure 30 regroupe les deux diagrammes d'éluion; elle montre que les deux fractions sont éluées de manière "classique", la fraction A dans la zone des PM élevés, la fraction B dans celle des PM plus faibles. A noter que le pic B est élué au niveau $V_e/V_o = 2,53$ alors que le cytochrome c (PM = 12 500) est élué pour une valeur $V_e/V_o = 2,18$. Il existe donc une très bonne concordance entre les résultats de la technique de séparation sur membrane PM10 et ceux de la filtration sur Sephadex G100.

* Reproductibilité de la technique

Cette vérification a été entreprise suite aux difficultés rencontrées par certains auteurs (HÜTTERMANN, 1977) lors de la rechromatographie, sur G100, de la fraction lignosulfonate de PM élevé isolée au cours d'un premier tamisage moléculaire sur gel de Sephadex G100. Une telle rechromatographie conduisait au dédoublement de la fraction avec formation de deux pics, l'un situé dans la région des PM élevés, l'autre dans la zone des PM plus réduits.

Le contrôle est effectué en deux étapes. La première consiste en une chromatographie, sur gel de Sephadex G50, d'une solution brute de LTG. L'éluat est recueilli en trois fractions (Fr1, Fr2 et Fr3) selon les indications de la figure 31A. La seconde étape consiste à rechromatographier chaque fraction sur la même colonne et dans les mêmes conditions. Les résultats, rassemblés sur la figure 31B, montrent l'excellente reproductibilité de la méthode. En particulier non seulement aucun dédoublement de pic n'est observé, mais encore l'éluion de chacun d'entre eux se situe dans la zone correspondant à celle de son prélèvement initial.

Figure 32 - Spectres UV-visible de solutions de LTG: **A)** et **B)**: spectres à pH 6 et 12, et spectre différentiel d'ionisation, respectivement avant (**A**) et après (**B**) action de la laccase. **C)**: spectres différentiels d'ionisation: a et b: avant et après oxydation enzymatique de la LTG; c: produit de dépolymérisation (pic II de la Figure 34).



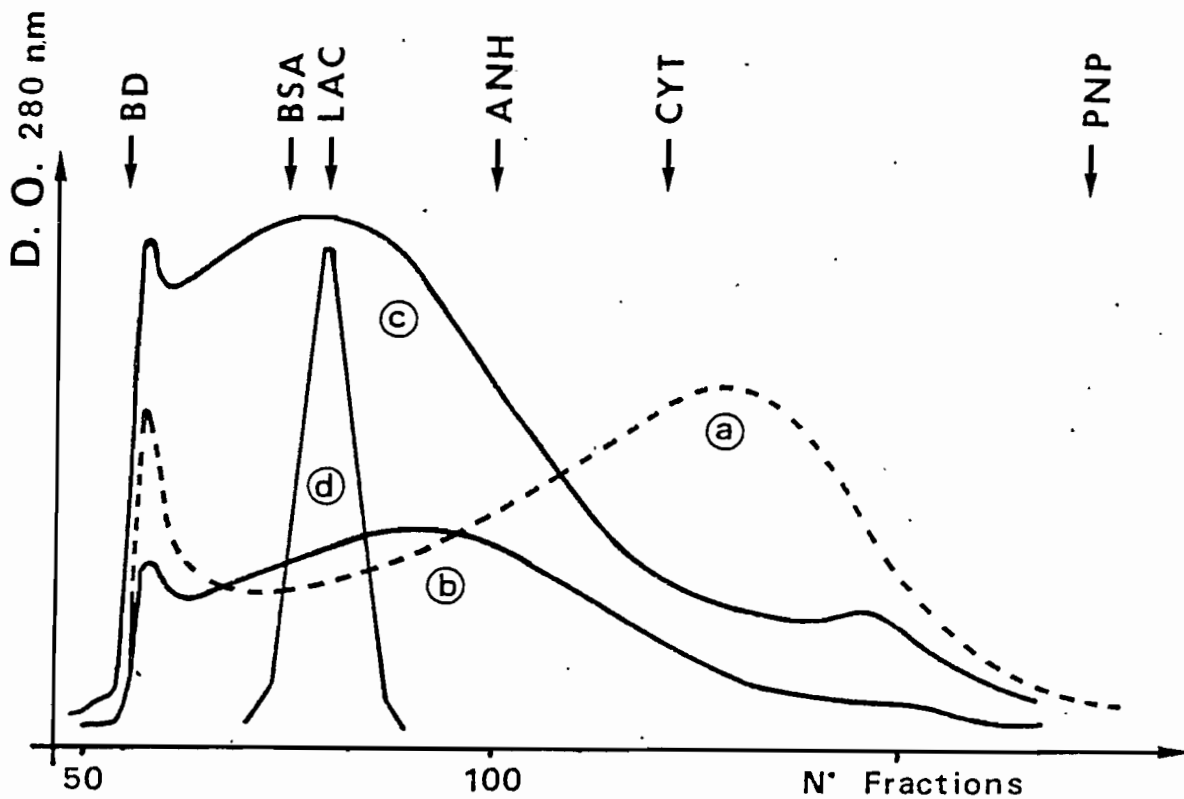


Figure 33 - Filtration sur Sephadex G100 d'une solution de LTG brute:
a) témoin (charge de la colonne: 70 DO_{280} ; **b)** après 21 heures d'incubation en présence de la laccase (milieu réactionnel: LTG 800 DO_{280} + 3050 U de laccase; volume 4ml; dépôt sur la colonne: 50 DO_{280} ; **c)** après 5 jours d'incubation (milieu réactionnel: LTG: 800 DO_{280} + 6.100 U de laccase; dépôt sur la colonne: 60 DO_{280}); **d)** profil d'éluion de l'activité laccase (unités relatives; il s'agit de l'activité présente dans les milieux réactionnels).

Il ressort de ces deux contrôles préliminaires que la technique de filtration sur gel de Sephadex, dans les conditions expérimentales décrites et avec le substrat choisi, est fiable et permet réellement de différencier, par leur taille, des classes de molécules de LTG.

2° Effet de la laccase sur la lignine thioglycolique

* Modifications spectrales

Dès l'initiation de la réaction, se manifestent un brunissement rapide de la solution et un accroissement de la DO à 280 nm pouvant atteindre 50% de la valeur initiale. Au niveau du spectre différentiel (Fig. 32 A, B et C) on note l'atténuation sensible du pic à 255nm, la très forte diminution du pic à 298 nm et, enfin, l'accentuation du pic à 365 nm. D'après les données de la littérature (GOLDSCHMID, 1971), ces modifications traduisent d'une part la diminution importante du nombre d'hydroxyles phénoliques ionisables et d'autre part, une augmentation de la proportion de groupes α -carbonyles du polymère.

* Modification du degré de polymérisation

Une première approche du phénomène a été réalisée en incubant, en présence de la laccase, une solution brute de LTG très hétérogène au plan de la taille des molécules qui la composent. Après respectivement 21 heures et 5 jours d'incubation, une partie aliquote du milieu réactionnel a été chromatographié sur Sephadex G100. L'analyse des diagrammes d'élution (Fig. 33) fournit deux renseignements fondamentaux:

- La laccase provoque un "déplacement" du pic originellement centré dans la zone des molécules de PM voisins de 10 000 D, vers une zone où sont éluées des molécules de masse molaire plus élevée. Elle traduit une condensation de ces molécules, d'autant plus importante que le temps d'incubation est plus long.

- Dans le cas d'une incubation de longue durée on observe, de plus, l'apparition d'un pic correspondant à des molécules de faible taille. Dans les conditions opératoires utilisées, l'origine de ce pic est cependant incertaine; il pourrait en effet s'agir non pas de la dépolymérisation d'une fraction macromoléculaire, mais du "démasquage" d'une fraction préexistante non encore polymérisée par la laccase. Ces molécules sont néanmoins oxydées par l'enzyme, leur spectre différentiel accusant les modifications caractéristiques déjà signalées (Fig. 32 B).

Notons enfin qu'après 5 jours d'incubation à température ambiante, la laccase est toujours active; dans la pratique la position du pic laccase sur les diagrammes d'élution des colonnes permet de vérifier la reproductibilité des chromatographies; elle constitue de plus un marqueur utile à l'estimation du PM des fractions de LTG.

Figure 34 - Dépolymérisation de la LTG par la laccase (légende: voir p.129).

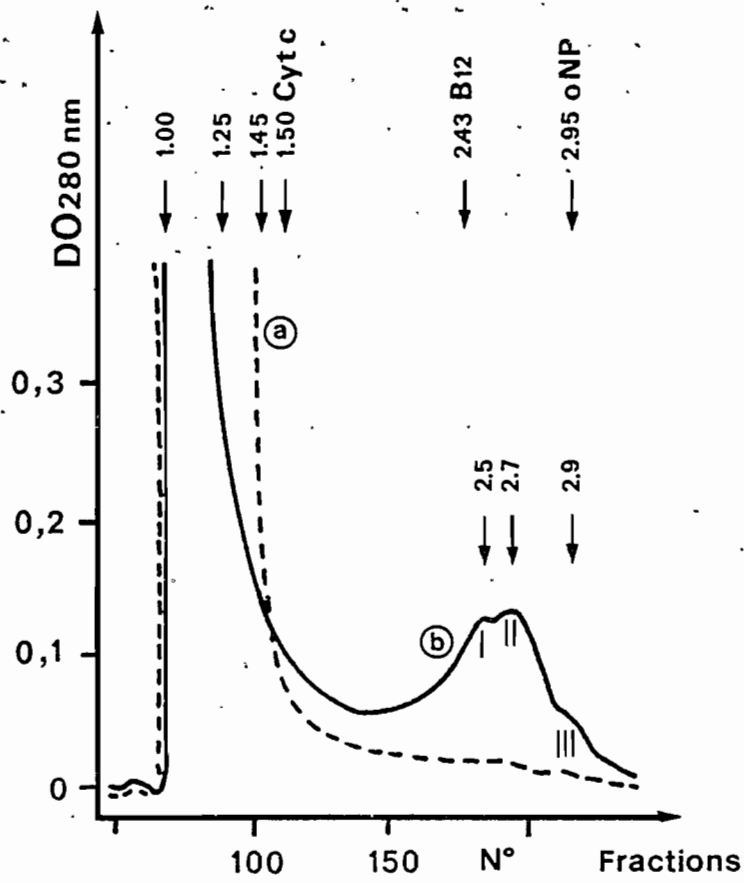
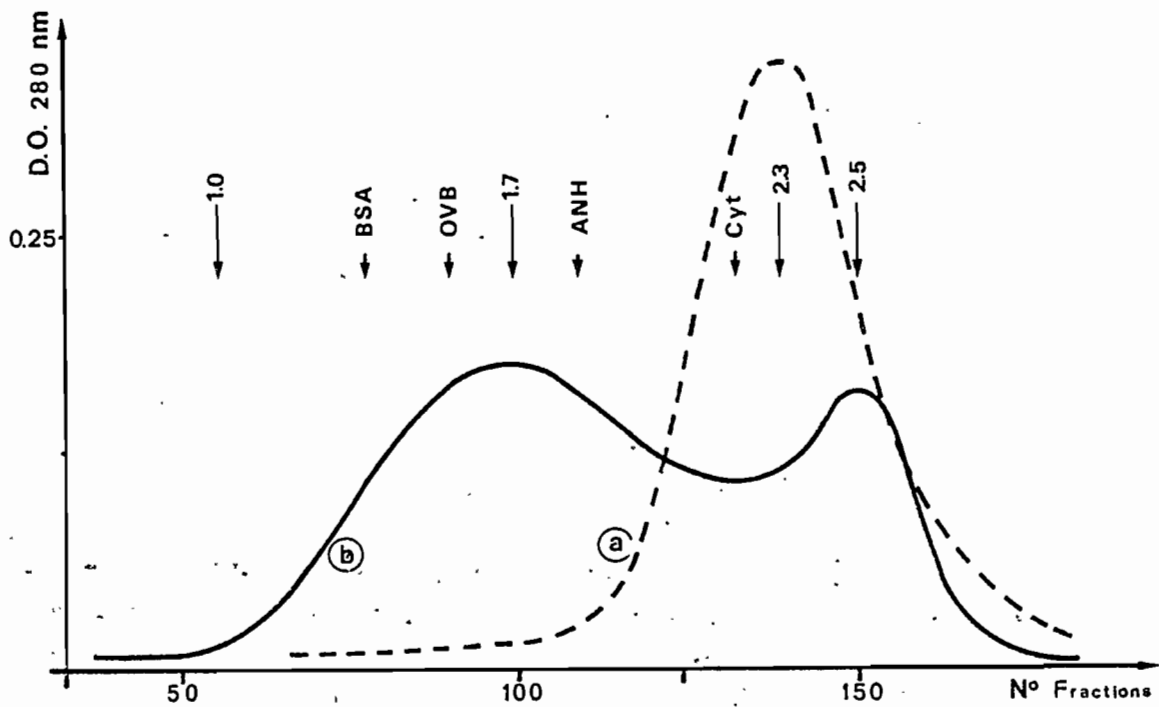


Figure 35 - Condensation de la LTG par la laccase (légende: voir p.129).



Afin de mieux mettre en évidence les deux actions de la laccase, nous avons réalisé une seconde série d'essais mettant en oeuvre, cette fois-ci, des substrats "selectionnés" d'après la taille des molécules. Ce tri préalable a été réalisé par fractionnement d'une solution brute de LTG sur gel de Sephadex. Pour la classe de PM élevé, nous avons choisi une fraction de type Fr1 isolée sur Sephadex G50 (Fig. 31 A); la classe de LTG de faible taille correspond à une fraction F4 isolée après chromatographie sur Sephadex G100 (Fig. 29).

* Activité de dépolymérisation

La Figure 34 révèle sans ambiguïté la dégradation d'une partie de la LTG en plusieurs composés de faible masse moléculaire. En effet, au moins trois pics (notés I, II et III) sont identifiables, dont les valeurs V_e/V_o sont, respectivement égales à 2,5; 2,7 et 2,9 alors que la partie descendante du pic correspondant à la fraction hautement polymérisée se situe au niveau 1,25 et que les molécules-étalon sont éluées pour les valeurs suivantes: cytc (PM: 12 500): 1,5; vitamine B12 (PM=1735): 2,43 ; o-nitrophénol (PM=139): 2,95. Les fractions I, II et III sont donc constituées de molécules de très faible taille. Quantitativement elles représentent environ 6,3% du matériel total élué de la colonne (estimation d'après les DO à 280 nm).

Toutes ces fractions présentent les caractéristiques spectrales de la LTG oxydée (Fig. 32 B et C), à l'exception de la fraction II dont le spectre différentiel se caractérise par un pic à 335 nm et la disparition des pics à 365 et 298 nm (Fig.32 C, courbe c).

Notons enfin qu'avant oxydation par la laccase, la partie descendante du pic des haut-PM (courbe témoin (a) Fig. 34) se produit pour une valeur de V_e/V_o égale à 1,45. La différence entre cette valeur et celle (1,25) enregistrée après action de l'enzyme témoigne de l'augmentation de PM d'une fraction du substrat.

* Activité de polymérisation

L'essai, réalisé en faisant agir la laccase sur une solution de LTG de faible PM (F4 de la Figure 29), met en évidence la réaction de condensation (Fig.35). Il en résulte le dédoublement du pic initial (graphe (a): $V_e/V_o = 2,3$)

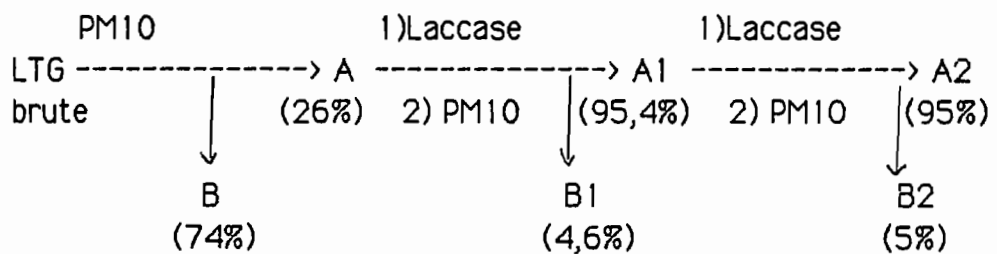
Fig. 34: Dépolymérisation de la LTG par la laccase. Filtration sur G50 d'une fraction type Fr1 (Fig 31 A) de PM élevé. **a)** témoin (dépot sur la colonne: 102 DO₂₈₀. **b)** après 9 jours d'incubation (milieu réactionnel: LTG: 545 DO₂₈₀ + 3050 U L1; vol. total: 5ml; charge colonne: 101 DO₂₈₀); total du matériel dégradé (Pics I + II + III) = 6,4%.

Fig. 35: Condensation de la LTG par la laccase. Filtration sur G100, d'une LTG de faible PM (type F4 Fig 29). **a)** Témoin: charge colonne: 11 DO₂₈₀; **b)** après 20 jours d'incubation en présence d'une laccase active (milieu réactionnel: 51 DO₂₈₀ + 12 200 U laccase; volume total: 4ml; charge colonne 11,6 DO₂₈₀). produits de condensation (graphe (b): $V_e/V_o = 1,7$) et d'une seconde (graphe (b): $V_e/V_o = 2,6$).

conduisant à la formation d'une première classe de molécules correspondant à des dont on ne peut affirmer avec certitude s'il s'agit de produits de dégradation ou simplement de résidus de la fraction originelle non encore condensés. Le spectre différentiel de ces deux classes de molécules présentent les caractéristiques de celui d'une LTG oxydée (Fig. 32 B et C).

* Essais de dégradation récurrente

Le fait que la laccase catalyse à la fois une réaction de condensation et une réaction de dépolymérisation suggère qu'il existe un équilibre entre ces deux réactions, à moins que chacune ne concerne spécifiquement qu'une classe particulière de molécules. Nous avons tenté de vérifier la première hypothèse en réalisant deux incubations successives dans les conditions ci-dessous:



L'intérêt de ce procédé est d'éliminer, entre les deux incubations, les produits de dégradation formés à la suite de la première incubation. Le fractionnement des milieux réactionnels est effectué par ultrafiltration sur membrane Amicon PM10. Les fractions A, A1 et A2 correspondent à des haut-polymères (PM > 10 000 D), les fractions B, B1 et B2 contiennent des produits de dépolymérisation (PM < 10 000 D). Enfin les nombres figurant entre parenthèses indiquent, en % du matériel total recueilli à chaque étape, la proportion de ce matériel récupéré dans chaque fraction.

Les résultats enregistrés sont en faveur de l'hypothèse selon laquelle il existe un équilibre entre réaction de condensation et réaction de dépolymérisation. Cette dernière peut se poursuivre en cas de déplacement artificiel de l'équilibre notamment en soustrayant du milieu réactionnel les produits de dégradation.

L'analyse spectrale des différentes fractions conduit à un autre résultat particulièrement significatif:

- Fractions A et B: spectre différentiel d'une LTG non oxydée (Fig. 32C (a))
- Fractions A1, A2 et B2: spectre d'une LTG oxydée (Fig. 32C (b))
- Fraction B1: spectre présentant un pic à 335 nm (Fig. 32C (c))

Le fait que seule la fraction B1 contienne le composé présentant cette

caractéristique spectrale spécifique signifie que la macromolécule de LTG comporte dans sa structure des liaisons chimiques particulières facilement rompues par la laccase (ou bien que la solution de LTG comporte plusieurs entités moléculaires structurellement différentes les unes de autres, l'une d'entre elles constituant un substrat privilégié pour l'enzyme). Des essais ultérieurs de purification de la fraction B1 par filtration sur gel de Sephadex G25 ont permis de séparer deux pics. L'un, largement dominant, présente le spectre différentiel caractérisé par un maximum à 335 nm, dépourvu de tout épaulement à 365 et 255nm, montrant que le composé a été isolé vraisemblablement avec un bon degré de pureté (il pourrait s'agir d'un composé comportant une structure de type phénylcoumarone); le second pic présente les caractéristiques spectrales classiques de la LTG oxydée.

c) DISCUSSION

Les résultats que nous avons acquis au cours des essais que nous venons de décrire, montrent que la laccase L1 de *R. lignosus* est capable d'effectuer à la fois la scission et la condensation de la lignine.

Ces résultats sont en accord avec ceux enregistrés notamment par ISHIHARA et MIYAZAKI (1972) pour l'action de la laccase A₂ de *Coriolus versicolor* sur une lignine de bois moulu. Ils sont également en accord avec les hypothèses de KIRK (KIRK et al., 1968b) qui prévoyait ce double effet de la laccase, les formes radicalaires induites conduisant soit à des produits de condensation, soit à une rupture de la liaison alkyl-aryle de certaines unités phénylpropanes de la lignine. D'après cet auteur une proportion importante des liaisons intermonomériques (41% pour la lignine d'épicéa) seraient théoriquement susceptibles de subir une rupture oxydative par la laccase. La scission des autres liaisons intermonomériques nécessite l'intervention d'autres enzymes, à moins que certaines de ces liaisons ne puissent être rompues par couplage avec des radicaux libres formés par l'action de la laccase sur des unités-substrat pour cette enzyme. Ainsi le vératrylglycérol-b-gaïacyl éther, qui n'est pas un substrat de la laccase en raison de l'absence d'hydroxyle phénolique libre, est oxydée chimiquement en présence de radicaux libres générés par la laccase dans la lignine de sciure de bois (KIRK et al., 1968 a).

Enfin il convient de faire une mention particulière pour les travaux de LEONOWICZ et collaborateurs (1985) qui, faisant agir une laccase purifiée de *Trametes versicolor* sur du lignosulfonate et utilisant des techniques d'estimation des PM identiques aux nôtres (filtration sur gel de Sephadex G50), ont enregistré des résultats comparables: la laccase effectue la dégradation de la lignine lorsqu'elle est incubée en présence de matériel de PM élevé, et une

réaction de condensation lorsque le substrat est un matériel de faible PM. De plus l'étude cinétique de ces réactions montre que les produits de dégradation peuvent être repolymérisés. L'accumulation de ces produits de dégradation tend vers un équilibre, après être passée par un maximum; comme dans notre cas, cet équilibre est largement en faveur des produits de polymérisation. L'installation d'un tel équilibre laisse supposer que, dans ce cas également, la réaction de dépolymérisation peut se poursuivre à condition que cet équilibre soit rompu.

La laccase, cependant n'est pas la seule "phénoloxydase" pouvant entraîner la dépolymérisation oxydative de la lignine. Ainsi, récemment, TIEN et KIRK (1983, 1984) ont identifié et purifié, à partir d'un filtrat de culture de *Phanerochaete chrysosporium*, une "oxygénase nécessitant, pour son fonctionnement, la présence d'eau oxygénée" capable de rompre la liaison C_a-C_b de la chaîne latérale d'unités phénylpropanes mêmes dépourvues d'hydroxyle phénolique libre. Cette "ligninase", de type peroxydase, catalyse également le couplage oxydatif de phénols pouvant aboutir à des produits de condensation. L'existence de ce même type d'enzyme a par ailleurs été confirmée par d'autres auteurs (GLENN et al., 1983 ; GOLD et al., 1984). Enfin SCHOEMAKER et al. (1985 et HARVEY et al. (1985) ont montré que cette "ligninase" agit exclusivement comme une peroxydase. L'enzyme exerce-t-elle son action de concert (ou en synergie) avec la laccase également dont ANDER et ERIKSSON (1976) ont démontré l'importance dans la ligninolyse ?

Par ailleurs LOBARZEWSKI (1984 ; LOBARZEWSKI et al., 1982) ont démontré que la peroxydase de *Trametes versicolor* (à la fois l'enzyme soluble et celle liée à la paroi du champignon) est, elle aussi, capable d'effectuer à la fois la dépolymérisation et la condensation du lignosulfonate ; ce résultat est, au moins en apparence, en contradiction avec celui obtenu par KAPLAN (1979).

Enfin des mécanismes, non enzymatiques, conduisant à la ligninolyse ont été décrits, mettant en œuvre le radical hydroxyle (BES et al., 1983 ; FAISON et KIRK, 1983).

En résumé: la laccase L1 de *R. lignosus* est effectivement capable de réaliser la rupture oxydative de la lignine. La similitude entre les enzymes L1, L2 et LN au plan de la spécificité de substrat, notamment leur commune aptitude à oxyder la LTG, nous conduit à penser que L2 et LN jouissent des mêmes potentialités que L1 en matière de dégradation de la lignine. **Enfin la concordance entre nos résultats et ceux obtenus par d'autres équipes sur des laccases d'autres champignons, suggère que ces enzymes constituent des marqueurs valables de l'aptitude à la ligninolyse des organismes qui les excrètent.**

IV. DEGRADATION D'AUTRES MACROMOLECULES.

A l'occasion de certaines expérimentations nous avons pu identifier des enzymes susceptibles d'être impliquées dans la dégradation de polymères différents de ceux que nous venons d'étudier. Ces enzymes n'ayant pas fait l'objet d'essais particuliers, nous ne ferons qu'évoquer ici leur existence et leur rôle possible.

1. Les estérases.

Dans les filtrats de culture de *R. lignosus* nous avons pu mettre en évidence une activité enzymatique catalysant l'hydrolyse des esters formés entre le p-nitrophénol et les acides gras suivants : butyrate, myristate, palmitate et stéarate. Les résultats indiquent que les dérivés du myristate et du palmitate constituent les substrats privilégiés.

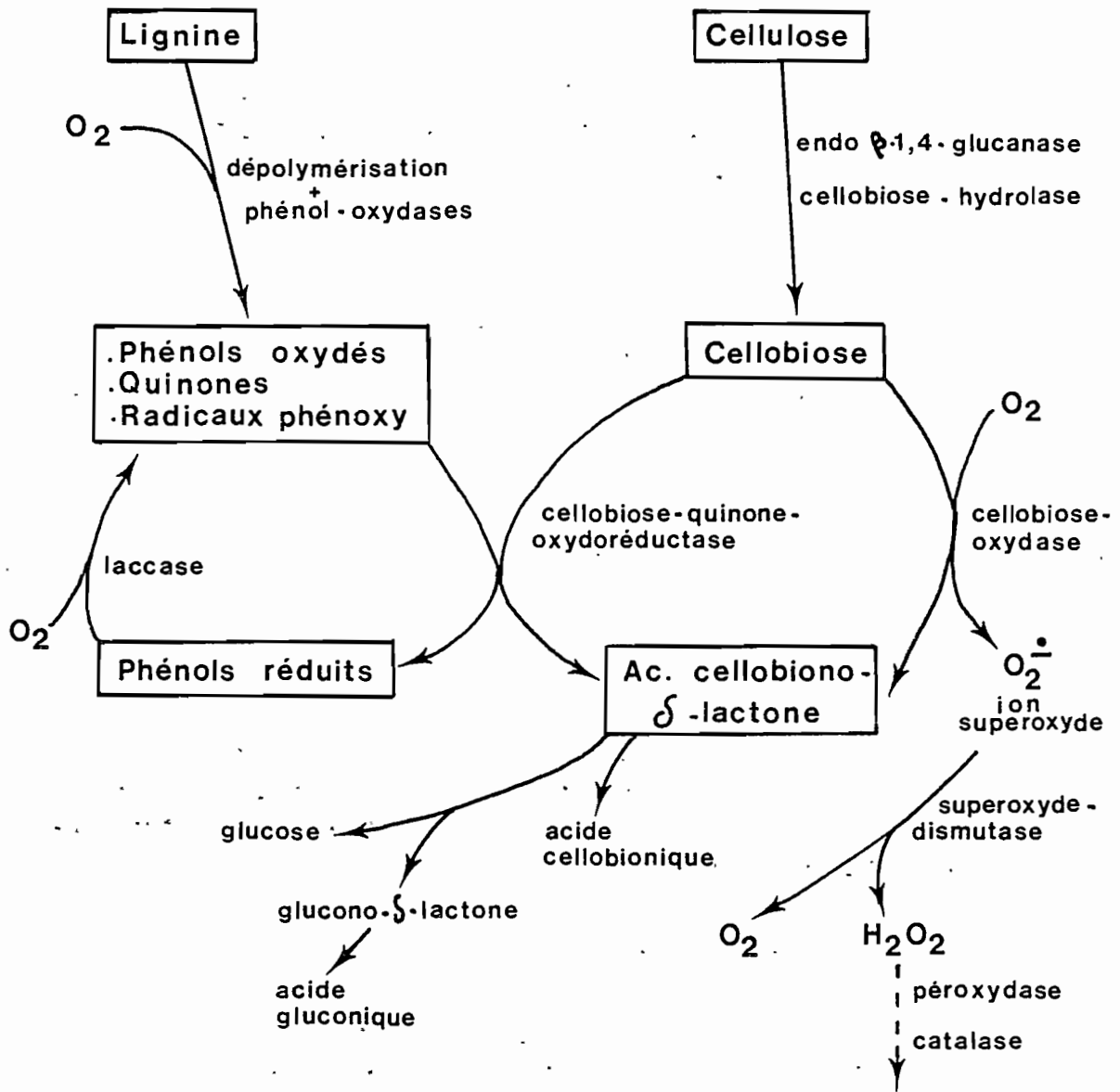
Le rôle de ces estérases n'a pas été déterminé ; néanmoins on peut envisager l'intervention de ce type d'enzyme, conjointement avec des phénol oxydases, dans la dégradation de la subérine. Ce copolymère d'acides gras hydroxylés ou dicarboxyliques et de phénols apparentés aux composés de type phénylpropane, dont la structure a été proposée par KOLATTUKUDY (1980; 1981) imprègne les parois des cellules du liège. D'après les observations au microscope *R. lignosus* dégrade très activement ces parois (NICOLE, 1984). Il est possible que cette caractéristique soit à mettre au compte de l'action conjointe de la laccase et des estérases excrétées par ce champignon. La première agirait sur la matrice polyphénolique, alors que les secondes libèreraient les acides gras rattachés à cette matrice par l'intermédiaire de liaisons ester. Ces estérases fragmenteraient également les chaînes d'acides gras polymérisés par formation de liaisons ester entre la fonction carboxyle d'un maillon et l'hydroxyle alcoolique d'un autre maillon (acide gras hydroxylé).

2. Les protéases.

Une activité protéolytique non négligeable a été détectée dans les filtrats de culture de *R. lignosus* mais non dans ceux de *P. noxius*. Une telle activité a également été identifiée *in vivo* dans les seuls tissus parasités par *R. lignosus*. Enfin une séparation électrophorétique réalisée à la fois sur des extraits de tissus parasités par *R. lignosus* et un filtrat de culture de ce champignon montre, après révélation de l'activité leucyl-aminopeptidase, la présence, dans les deux cas, d'une seule et même isoenzyme. La migration électrophorétique de cette isoenzyme est différente de celle présente dans les tissus sains. La protéase des tissus infectés par *R. lignosus* est donc d'origine fongique.

Le rôle de cette enzyme peut être multiple : dégradation des matières protéiques de la membrane cytoplasmique ou des nombreuses protéines du

Figure 36 - Relation entre la cellulolyse et la ligninolyse.



Relation entre les voies de biodégradation de la Lignine et de la Cellulose

cytoplasme. Rappelons également que dans certains cas on a observé un effet synergique important entre polygalacturonase et protéase dans le phénomène de macération tissulaire (BATEMAN et MILLAR, 1966).

3. Enzymes recherchées mais non identifiées dans les milieux de culture et les extraits tissulaires.

Nous avons tenté de détecter trois activités enzymatiques qui nous paraissaient importantes en raison de leur participation potentielle dans le catabolisme de la lignine et/ou de la cellulose (Fig. 36).

a) La cellobiose -quinone oxydoréductase

Identifiée par WESTERMARK et ERIKSSON (1974 a et b; 1975), cette enzyme réalise l'interconnexion entre la voie de dégradation de la cellulose et celle de la lignine. Cette activité conduit d'une part à l'oxydation du cellobiose en acide cellobionique (interdisant par le fait même toute possibilité de repolymérisation à partir du diholoside ou toute action inhibitrice sur les endo- et exo-glucanases) et d'autre part à la réduction des quinones en diphénols correspondant, ces derniers étant seuls susceptibles de constituer un substrat pour les oxygénases.

b) La cellobiose oxydase

Identifiée par AYERS et al. (1978) dans les filtrats de culture de *S. pulverulentum*, cette enzyme utilise l'oxygène moléculaire pour oxyder le cellobiose et les cellodextrines. Les produits de réaction sont, respectivement les acides oniques et l'anion superoxyde O_2^- .

c) La superoxyde dismutase (SOD)

L'anion superoxyde, fortement réactif et éventuellement toxique pour le champignon est dismuté en H_2O_2 et O_2 par cette enzyme identifiée dans les filtrats de culture de *S. pulverulentum* (ERIKSSON, 1981b). Elle existe dans les tissus laticifères de l'Hévéa (CHRESTIN, 1984) où elle joue un rôle de protection de l'intégrité de la membrane lutoïdique comportant des lipides à acides gras désaturés dont la double liaison est susceptible de subir une rupture oxydative par l'anion superoxyde.

Il est à noter que les extraits de tissus ainsi que les filtrats de culture (sur sciure ou extrait de sciure) présentent une activité "SOD-Like" d'origine non enzymatique (thermostable). La nature du principe actif n'est pas connue, ni son mode d'action : inhibition du système générateur de l'ion superoxyde (Xanthine -

Xanthineoxydase) ou destruction chimique de l'ion produit par le système ?

D'après ERIKSSON (communication personnelle) tous les agents de pourriture blanche qu'il lui a été donné d'étudier, possèdent ces trois enzymes. Leur absence chez *R. lignosus* et *P. noxius* paraît donc *a priori* surprenante. D'après ce même auteur, ces enzymes sont produites plus activement par lorsque les champignons sont cultivés sur milieu à base de cellulose. Des essais réalisés en ce sens n'ont pas davantage été couronnés de succès. *R. lignosus* et *P. noxius* seraient-ils des champignons atypiques en la matière ?

V. DISCUSSION

Les résultats que nous venons de présenter révèlent que *R. lignosus* et *P. noxius* excrètent un ensemble d'enzymes dont l'action, combinée ou séquentielle, doit théoriquement conduire à la dégradation de la plupart des polymères de structure des tissus du bois, en particulier la cellulose, les matières pectiques, les xylanes et la lignine. Les résultats que nous avons enregistrés font apparaître un faisceau de corrélations qui milite en faveur de l'intervention effective des enzymes dans la dégradation tissulaire. ces corrélations sont les suivantes:

- des activités enzymatiques sont décelées dans les tissus parasités de l'hôte ; à l'exception de l'activité peroxydasique, elles sont dues à des enzymes différentes de celles des tissus sains ;

- ces enzymes sont identiques à celles produites spécifiquement par l'agent pathogène infectant, lorsqu'il est cultivé en culture pure. Les enzymes des tissus parasités sont donc d'origine fongique.

- ces enzymes provoquent *in vitro* (et en milieu acellulaire) la dégradation de la sciure de bois, donc du complexe naturel. Ce pool enzymatique est par ailleurs composé d'enzymes responsables de la dégradation des principaux polymères constitutifs de la cellule végétale, lignifiée ou non.

- *In vivo*, l'observation au microscope photonique et électronique confirme l'existence de la dégradation des principales "substructures cellulaires": lamelle moyenne, paroi primaire et paroi secondaire, impliquant la destruction effective des polymères constitutifs, notamment celle des matières pectiques de la cellulose et de la lignine.

- Ces altérations ont lieu au niveau des tissus infectés mais, le plus souvent à quelque distance des hyphes mycéliennes.

- C'est dans ces mêmes tissus que sont excrétées les enzymes du champignon, enzymes agissant à distance des hyphes mycéliennes.

La conclusion logique de cet ensemble de données est que les enzymes excrétées par les parasites dans les tissus qu'ils envahissent

sont effectivement responsables, en fonction de leur spécificité respective, de la dégradation des polymères constitutifs des structures cellulaires et, par conséquent, responsables de l'altération des tissus. Elles sont donc susceptibles de moduler le comportement parasitaire des champignons. Il est à noter, comme le souligne TOUZE (1977) que cette implication des enzymes dans la pathogénie des deux parasites ne permet pas pour autant de conclure si ces enzymes sont, ou non, les déterminants primaires du pouvoir infectieux.

CHAPITRE III

REACTION DE L'HEVEA A L'AGRESSION PARASITAIRE: LA STIMULATION DE L'ACTIVITE PEROXYDASIQUE

Nous avons vu que l'attaque parasitaire opérée par *R. lignosus* et *P. noxius* provoque, au niveau des tissus de l'Hévéa, une perturbation complexe de diverses activités enzymatiques présentes dans ces tissus. Parmi les modifications mises en évidence, seule la peroxydase dont l'activité augmente dans des proportions considérables au niveau des tissus proches du front de progression du parasite, est synthétisée par l'Hévéa lui-même et correspond à une réaction de l'arbre.

Nous avons porté une attention particulière à ce type d'enzyme en raison de son implication dans la biosynthèse des lignines, notamment celles synthétisées par les plantes en réaction aux agressions parasitaires qu'elles subissent (voir les revues : TOUZE et ESQUERRE-TUGAYE, 1982 ; VANCE et al., 1980). L'efficacité de la lignification en tant que mécanisme de résistance a été proposé et, dans certains cas démontrée, par de nombreux auteurs (HIJWEGEN, 1963 ; ASADA et MATSUMOTO, 1969, 1972 ; RIDE, 1975, 1978 ; VANCE et SHERWOOD, 1976, 1977, KIMMINS et WUDDAH, 1977).

L'intervention de la lignification dans les phénomènes de prémuniton a également été démontrée (TOUZE et ROSSIGNOL, 1977 ; HAMMERSCHMIDT et KUC, 1982). Enfin une lignification de la paroi mycélienne en présence d'alcool coniférylique, d'eau oxygénée et de peroxydase a été observée et proposée comme un mécanisme indirect contribuant au phénomène de résistance, puisque provoquant la diminution de la vitesse de croissance du champignon (HAMMERSCHMIDT et KUC, 1982).

Si la recherche d'une corrélation entre lignification et augmentation des enzymes de la chaîne de biosynthèse de phénylpropane: phényalanine- ou tyrosine- ammoniac lyase (PAL ou TAL), o-méthyl transférase (OMT) et cinnamate CoA Ligase, a été l'objet de nombreuses études (GREEN et al., 1975 ; MAULE et RIDE, 1976; VANCE et al., 1976; VANCE et SHERWOOD, 1976 a et b); HENDERSON et FRIEND, 1979; FRIEND et al., 1973; FRITIG et al., 1973 *inter alia*), par contre l'intervention de la peroxydase en tant que responsable de l'étape de polymérisation semble avoir soulevé moins d'intérêt. Néanmoins le rôle fondamental de cette enzyme dans la lignification a été précisé par divers auteurs (OHGUCHI et al., 1974 ; OHGUCHI et ASADA, 1974 ; ASADA, 1978 ; VANCE et al. 1976).

Tableau 13

Activité peroxydasique (U/g poids frais) contenue dans des extraits bruts de différents types de tissus. (Les résultats sont présentés pivot par pivot afin de mettre en évidence la variabilité des activités enzymatiques).

N° du pivot	Nature des tissus			
	S	P (<i>R. lignosus</i>)	P (<i>P. noxius</i>)	R
1	23 000	21 000	-	-
2	12 160	6 748	-	-
3	5 700	15 950	-	-
4	13 275	23 670	-	-
5	14 175	10 240	-	-
6	-	48 870	-	-
7	9 870	-	-	-
8	27 300	-	-	-
9	18 675	156 500	-	18 600
10	10 835	91 200	-	-
11	17 200	114 600	-	-
12 (S et P)	6 400	17 950	-	-
12 (SF)	10 900	-	-	-
13	7 500	11 000	-	15 375
14	15 000	32 750	-	-
15	-	61 250	-	-
16 (S et P)	1 672	-	2 332	-
16 (SF et PF)	1 360	-	10 100	-
17 (S et P)	4 800	-	+	-
17 (PF)	-	-	34	-
18 (PF)	-	-	245	-
18 (P)	-	-	0	-
19	14 280	-	2 714	-
20	6 160	-	-	-
21 (<i>S. r.</i>)	-	-	-	30 800
22 (<i>S. r.</i>)	-	-	-	31 240
23 (<i>S. r.</i>)	-	-	-	21 120
24 (<i>S. r.</i>)	-	-	-	23 760
25	7 010	-	-	-
26 (<i>S. r.</i>)	-	-	-	30 066
27 (<i>S. r.</i>)	-	-	-	46 957
28 (<i>S. r.</i>)	-	-	-	26 897
29 (<i>S. r.</i>)	-	-	-	20 960
MOYENNE	11 484	48 571	2 145	26 577

(*S. r.*) indique que les tissus R sont prélevés sur un pivot infecté par *S. repens*. S, SF, PF et P désignent la nature des tissus selon le code habituel.

Il est à noter que toutes les recherches que nous venons de citer ont été réalisées sur des plantes succulentes ou herbacées, des organes foliaires ou des tranches de tubercules ; à notre connaissance aucune approche du même type n'a été effectuée sur un organe lignifié. Notre étude sur le couple Hévée - *R. lignosus* et Hévée - *P. noxius* présente donc une double originalité : puisque effectuée sur un tissu lignifié, de surcroît attaqué par des parasites lignolytiques.

I EFFET DE L'INFECTION SUR L'ACTIVITE PEROXYDASIQUE DES TISSUS.

1. VARIATION DE L'ACTIVITE PEROXYDASIQUE TOTALE.

Dès l'initiation de cette étude deux observations ont pu être faites :

- l'activité peroxydasique des tissus parasités est généralement supérieure à celle des tissus sains.
- il existe une forte variabilité "inter-arbrés" au niveau des activités peroxydasiques.

C'est pourquoi, afin de préciser les événements qui surviennent au moment de l'infection, nous avons analysé, dans des conditions standardisées,, un nombre élevé de pivots.

Le tableau 13 présente l'ensemble des résultats que nous avons enregistrés, pivot par pivot:

a) En moyenne l'infection par *R. lignosus* provoque dans les tissus parasités, un accroissement de l'activité peroxydasique (multiplication par un facteur 4). L'infection par *P. noxius*, entraîne, en moyenne, une diminution de cette activité. Enfin les tissus de réaction possèdent, en moyenne, une activité environ deux fois supérieure à celle des tissus sains.

b) Ces moyennes recouvrent en fait des situations variées. En effet si l'on examine les résultats, individu par individu, on s'aperçoit que le facteur de stimulation de l'activité peroxydasique peut atteindre une valeur proche de 10. Dans quatre cas cette valeur est, par contre, inférieure à 1 (pivots 1 et 5 partiellement infectés par *R. lignosus* ; pivots 17 et 19, colonisés par *P. noxius*).

La très importante variabilité inter-individus apparaît clairement, tant au niveau des activités peroxydases des tissus sains qu'à celui des tissus parasités. Son origine est cependant mal définie; plusieurs sources de variabilité peuvent être envisagées :

- âge des arbres ; celui-ci est le plus souvent compris entre 4 et 8 ans
- origine des prélèvements (trois plantations différentes)
- différences génétiques.

Cette dernière source de variabilité est sans doute la plus importante. En effet comme nous l'avons déjà signalé, les pivots appartiennent à des familles illégitimes dont les individus sont, par définition, génétiquement moins proches que ne le sont des individus issus d'un clône. De plus, en plantation les pivots proviennent de plusieurs familles illégitimes et sont répartis au hasard. Ainsi nous ne pouvons connaître l'origine génétique des pivots que nous analysons. (Il est à noter qu'une importante variabilité existe même au niveau des clones comme en témoigne la variabilité des activités enzymatiques du latex (CHRESTIN, 1984).

Ces résultats bruts indiquent bien l'existence d'une perturbation du système peroxydasique induite par l'infection, sans que l'on puisse pour autant, à ce stade de l'étude, la qualifier d'exceptionnelle par comparaison avec celle enregistrée pour d'autres couples hôte-parasite.

2. SPECIFICITE DE LA REACTION DE L'ARBRE AU NIVEAU DE LA PRODUCTION D'ISOPEROXYDASES

Cette spécificité est apparue lors d'essais d'isolement des peroxydases des tissus sains et des tissus parasités, par chromatographie sur DEAE-Cellulose. Cette technique permet de séparer les enzymes en deux classes :

- celles qui, dans les conditions expérimentales définies, ne sont pas adsorbées sur l'échangeur d'ions et sont donc recueillies, à la sortie de la colonne, avec l'effluent (= fraction "EF") ;
- celles qui, dans les mêmes conditions restent adsorbées sur l'échangeur et peuvent être éluées par un tampon de force ionique élevée (= fraction "EL").

Au plan technique nous procédons de la manière suivante:

une quantité déterminée d'extrait brut (dont on a mesuré l'activité peroxydasique totale peroxydase) est déposée au sommet d'une colonne de DEAE-cellulose (DE52) (d = 2 cm; h = 12 cm) équilibrée dans un tampon phosphate de sodium 0,0125 M à pH 6. Après adsorption, la colonne est lavée par le tampon d'équilibration, jusqu'à ce que l'activité peroxydasique de "effluante" devienne nulle. L'effluent total est recueilli (=fraction "EF"). On procède ensuite à l'éluion totale des peroxydases adsorbées sur la DE52 par un tampon de force ionique élevée (phosphate 0,0125 M, pH 6; NaCl 0,25 M). Cette éluion est poursuivie tant que l'éluat présente une activité peroxydasique. La totalité de l'éluat est

Tableau 14 - Proportion de l'activité peroxydasique contenue dans les deux fractions, effluent (EF) et éluat (EL) séparées par chromatographie sur colonne de DEAE-cellulose. Effet de la concentration en ions calcium sur l'activité peroxydasique de la fraction EL.

Pivots	Extraits de tissus sains			Extraits de tissus parasités			Extraits de tissus réactionnels		
	Effluent	Eluat DE 52		Effluent	Eluat DE 52		Effluent	Eluat DE 52	
	% (1)	% (1)	% act. (- Ca ⁺⁺)	% (1)	% (1)	% act. (- Ca ⁺⁺)	% (1)	% (1)	% act. (- Ca ⁺⁺)
1 (R.l.)	89	11	19	1	99	110	-	-	-
2 (R.l.)	67	33	18	0	100	-	-	-	-
3 (R.l.)	65,6	34,4	15	0,2	99,8	96	-	-	-
7 (R.l.)	75	25	24	-	-	-	-	-	-
8 (TS)	97,3	2,7	9	-	-	-	-	-	-
9 (R.l.)	52	48	49	1,2	98,8	104	18	82	70
10 (R.l.)	72	28	19,4	0,1	99,9	104	-	-	-
13 (R.l.)	78	22	38	0	100	104	8,2	91,8	93
19 (P.n.)	70,7	29,3	-	2,3	97,7	-	-	-	-
20 (TS)	65	35	35	-	-	-	-	-	-
21 (S.r.)	-	-	-	-	-	-	5	95	111
22 (S.r.)	-	-	-	-	-	-	11	89	88
23 (S.r.)	-	-	-	-	-	-	10	90	94
24 (S.r.)	-	-	-	-	-	-	21	79	90
25 (TS)	88,5	11,5	-	-	-	-	-	-	-
26-29 (S.r.)	-	-	-	-	-	-	13,7	86,3	91

(1): % calculé par rapport à l'activité de l'extrait brut. (2): valeurs exprimées en pourcentage de l'activité résiduelle en l'absence d'ions calcium, par rapport à l'activité en présence d'ions calcium (0,005M). Les pivots: 1, 2, 3, 7, 9, 10, et 13 sont partiellement envahis par *R. lignosus*; les pivots 8, 20 et 25 proviennent d'arbres sains; le pivot 19 est partiellement colonisé par *P. noxius*; Les pivots 21 à 24 et 26 à 29 sont envahis par *S. repens*.

recueillie (= fraction "EL").

L'activité peroxydasique est déterminée sur l'une et l'autre fraction, ce qui permet de calculer sa répartition entre les fractions EF et EL (exprimée en pourcentage par rapport à l'activité totale EF + EL). Le rendement de ces colonnes avoisine généralement 85 - 90%.

Le tableau 14 présente deux types de résultats concernant:

- La distribution de l'activité peroxydasique suivant les fractions que nous venons de définir: EF et EL;

- L'effet des ions calcium sur l'activité des peroxydases recueillies dans la fraction EL (tests enzymatiques réalisés en milieu Tris-maléate 0,05 M à pH 6,8, additionné ou non de CaCl₂ à une concentration égale à 0,005M (changement de tampon pour éviter la précipitation du calcium sous la forme de phosphate de calcium).

a) Répartition des peroxydases entre les fractions EF et EL

Le résultat le plus remarquable concerne la variation des proportions relatives de l'activité peroxydasique des fractions EF et EL en fonction de la nature des tissus

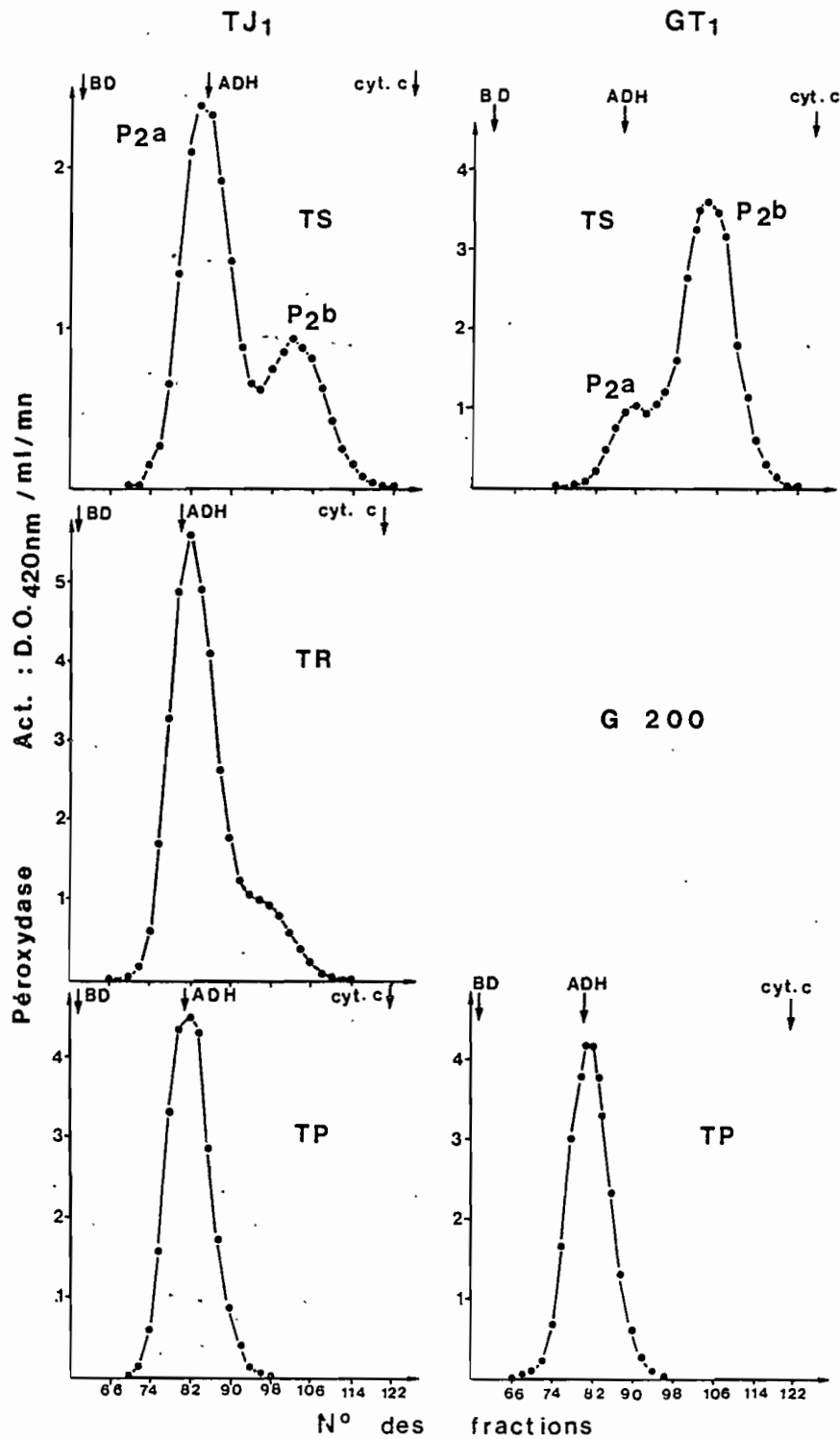
De manière très globale on peut condenser les résultats du tableau. 14 sous la forme suivante:

	EF	EL
TS	65 - 95 %	35 - 5 %
TP	0 - 3 %	100 - 97 %
TR	5 - 20 %	95 - 80 %

Il en ressort clairement que l'agression parasitaire provoque une perturbation de l'activité peroxydasique des tissus, non seulement au plan quantitatif mais également qualitatif. En effet la proportion des activités contenues respectivement dans EF et EL est systématiquement modifiée.

Nous insistons sur l'aspect systématique de cette perturbation car elle est enregistrée même pour des pivots "atypique" (N° 1 et 19) où l'activité peroxydasique totale (extrait brut) des tissus parasités est inférieure à celle des tissus sains. (A noter que cette observation tendrait à prouver que le pivot n'est atypique que par l'aspect quantitatif de la réaction peroxydasique et non par son aspect qualitatif.

Figure 37 - Séparation des peroxydases de la fraction "EL DE52" en deux sous-fractions, P2a et P2b, par filtration sur colonne de gel de Sephadex G200 en milieu Tris-HCl 0,025M à pH 8,4 contenant du KCl 0,1M. TS, TR et TP désignent la provenance tissulaire des extraits (tissus sains, réactionnels ou parasités par *R. lignosus*); TJ1 et GT1 désignent l'origine clonale (famille illégitime) des pivots (N° 9 et 10).



Enfin, les extraits de tissus de réaction présentent, en ce qui concerne la répartition des peroxydases, des caractéristiques plus proches de celles d'un tissu parasité que de celles d'un tissu sain. Rappelons que les tissus de réaction sont dépourvus de toute contamination par les parasites ayant provoqué la néogénèse tissulaire.

b) Effet des ions calcium sur l'activité peroxydasique de la fraction EL

Les résultats (Tabl. 14) montrent que l'activité peroxydasique de la fraction EL provenant des tissus parasités est indépendante des ions calcium (elle serait plutôt légèrement inhibée par ces ions), alors que celle extraite des tissus sains y est particulièrement sensible. **L'activité peroxydasique de la fraction EL des tissus de réaction présente des caractéristiques se rapprochant de celles de la fraction homologue des tissus parasités.**

Si l'on étudie plus en détail cet effet calcium, pivot par pivot, on est frappé par sa variabilité: l'activité spécifique résiduelle, en l'absence de calcium varie de 5 à 49% (calculée par rapport à l'activité enregistrée en présence de Ca^{++} à la concentration de 0,005 M). Une telle variabilité implique nécessairement l'existence d'une hétérogénéité au niveau de la fraction EL TS. Cette fraction doit comporter au moins deux peroxydases différant entre elles par leur degré de sensibilité au calcium

c) Fractionnement des peroxydases "EL DE52" par filtration sur colonne de gel de Séphadex G200

Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons effectué un fractionnement des peroxydases "EL DE52" sur G200 (colonne d=1,8 cm; h= 100 cm; équilibration et élution en tampon Tris-HCl 0,05M à pH 8,4; KCl 0,1M

La figure 37 présente les diagrammes d'élution de 5 fractions EL provenant de deux pivots différents (9 et 10), l'une de ces fractions étant extraite de tissus de réaction.

Ces diagrammes confirment **la présence, dans la fraction EL des tissus sains, de deux enzymes** (ou classes d'enzymes) respectivement appelées **P2a** et **P2b**, différant entre elles par:

- leur Poids Moléculaire
- leur sensibilité aux ions calcium (Fig. 38)

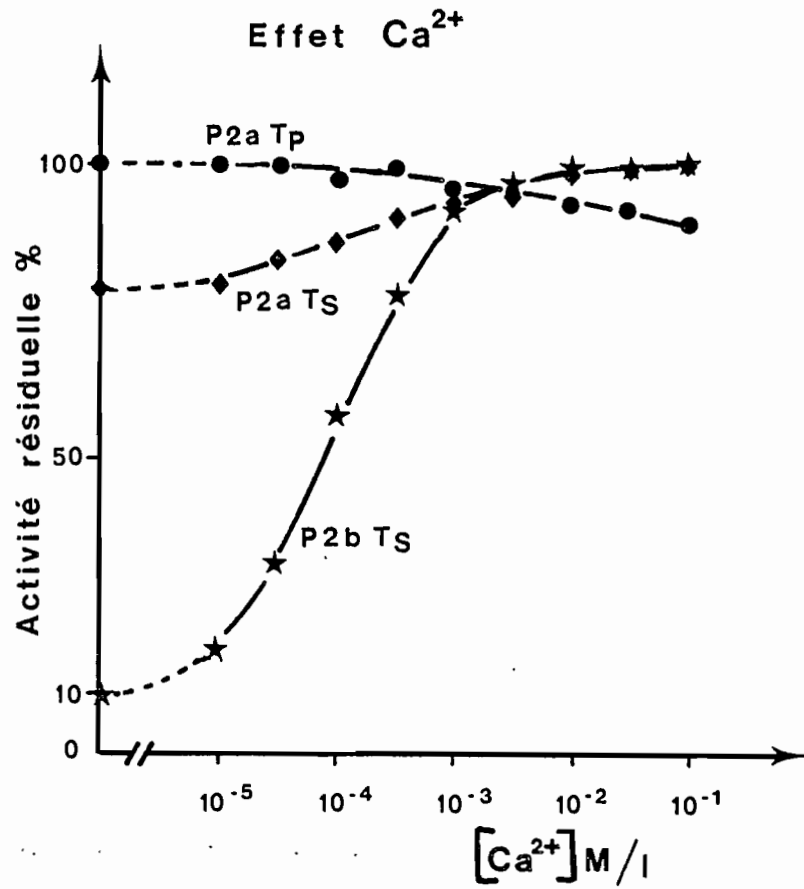


Figure 38 - Effet de la concentration en ions calcium sur les activités peroxydasiques des fractions P2a TP (tissus parasités) P2a et P2b TS (tissus sains) séparées par filtration sur gel de Sephadex G200 (voir Figure 37).

Tableau 15

Estimation de la contribution de la peroxydase P2a à l'activité totale des extraits de tissus: comparaison entre les valeurs enregistrées expérimentalement (fractionnement sur Sephadex G200) et les valeurs calculées.

Tissus	E1 : % activité résiduelle (-Ca ⁺⁺)	% P2a calculé	% P2a expérimental (sép. sur G200)
Pivot 9			
S	58	51	62
P	104	99	100
R	69	62	79
Pivot 10			
S	24	14,7	16
P	104	99	100

Bases du calcul

P2a pure : % activité résiduelle en l'absence de calcium = 105.

P2b pure : %..... = 10

$$\text{D'où : } \begin{cases} 105x + 10y = Z \\ x + y = 1 \end{cases} \quad \rightarrow x = \frac{Z - 10}{95}$$

où : Z = activité résiduelle en l'absence de Ca⁺⁺ (valeur expérimentale en %)

x = fraction de l'activité attribuable à P2a

y = fraction de l'activité attribuable à P2b

(avec x et y tels que : 0 < x < 1 ; 0 < y < 1)

La fraction EL des tissus parasités ne contient que l'enzyme P2a, tandis que la fraction EL des **tissus de réaction** ne contient qu'un faible pourcentage de P2b et **se rapproche donc également, par ce caractère, des caractéristiques des extraits de tissus parasités.**

Notons enfin que la composition de la fraction EL issue des tissus sains peut varier sans que l'on puisse savoir s'il s'agit d'une caractéristique des familles illégitimes ou d'une perturbation de l'équipement enzymatique attribuable à la proximité du front de progression du champignon.

En résumé, il ressort de tous ces résultats que l'attaque parasitaire provoque une augmentation de l'activité peroxydasique au niveau des tissus infestés d'une part, des tissus réactionnels d'autre part; cet accroissement est principalement à mettre au compte d'une seule fraction : P2a.

d) Essai de quantification de la réaction peroxydasique.

L'estimation de l'augmentation de l'activité P2a peut s'effectuer expérimentalement par comparaison de l'activité récoltée dans les diverses fractions isolées au cours des étapes de purification successives par chromatographie sur DEAE-Cellulose et gel de Sephadex G200.

Cependant, théoriquement, le pourcentage de l'activité P2a par rapport à l'activité globale doit pouvoir être calculé à partir des trois données suivantes:

- * Activité globale
- * Activité EL DE52
- * Activité spécifique résiduelle de la fraction EL en l'absence de Ca^{++}

Compte-tenu des valeurs expérimentales enregistrées pour l'effet calcium sur P2a et P2b l'application de l'équation (A) (Tableau 15) nous fournit le pourcentage de P2a dans la fraction EL.

Le tableau 15 présente des résultats comparatifs obtenus par la méthode expérimentale et la méthode mixte. La concordance entre ces deux méthodes est bonne pour des valeurs extrêmes des pourcentages d'activité résiduelle en l'absence de Ca^{++} ; pour des valeurs médianes la technique de calcul conduit apparemment à des résultats par défaut, mais autorise tout de même une estimation approchée de la proportion de P2a par rapport à l'activité peroxydasique globale.

Cette méthode de calcul a été mise à profit pour évaluer l'incidence de l'infection, la stimulation de l'activité P2a dans différents types de tissus. Le tableau 16 fournit les résultats d'une telle évaluation à propos desquels nous ferons les remarques suivantes :

Tableau 16

Répartition de l'activité peroxydasique P2a au sein de quelques pivots d'Hévéea

Nature des tissus et act. spéc: ext. brut U/g PF)	Activité dans éluat DE52		Peroxydase P2a (valeurs calculées)			
	% de l'extrait brut	% act. résid. (-Ca ⁺⁺)	% de l'act. E1 DE52	% de l'act. totale	Act. spéc. (U/g PF)	Taux de stimulation
Pivot 9						
S 18 675	48	58	51	24	4 527	1
P 156 500	98,8	104	99	97,8	153 076	34
R 18 600	82	69	62	50,8	9 456	2
Pivot 10						
S 10 835	33	24	14,7	4,8	525	1
P 91 200	99,9	104	99	99	90 198	171
Pivot 13						
S 7 500	22	39	29	6,4	478	1
SF 3 875	75	57	49	36,7	1 424	3
PF 67 500	98,5	108	100	98,5	66 487	140
P 11 000	100	104	99	99	10 890	23
R 15 375	91,8	93	87	80	12 280	26

- La **stimulation** de l'activité P2a peut atteindre des proportions considérables puisque dans le cas du pivot n° 10 elle atteint **un facteur égal à 170**. Un tel facteur n'a rien de commun avec ceux habituellement enregistrés (+50 à +300 %) pour des couples hôte-parasite différents.

- Très généralement dans le cas d'autres couples hôte-parasite la stimulation de l'activité concerne l'ensemble ou au minimum un groupe d'isoperoxydases. **Dans le cas de l'Hévéa** (pivot d'arbre adulte) **une seule isoperoxydase semble en priorité être impliquée dans la réaction de l'arbre**.

- La réaction à l'agression se manifeste déjà au niveau des tissus sains proches du front de progression du parasite (pivot 13 : TSF); en effet, alors que l'activité de l'extrait brut diminue de près de 50% (S: 7500 U/g --> SF: 3875 U/g), la proportion de la fraction EL augmente considérablement (22 --> 75%) tandis que la sensibilité au calcium diminue (activité résiduelle en l'absence de Ca⁺⁺: 39 --> 57%).

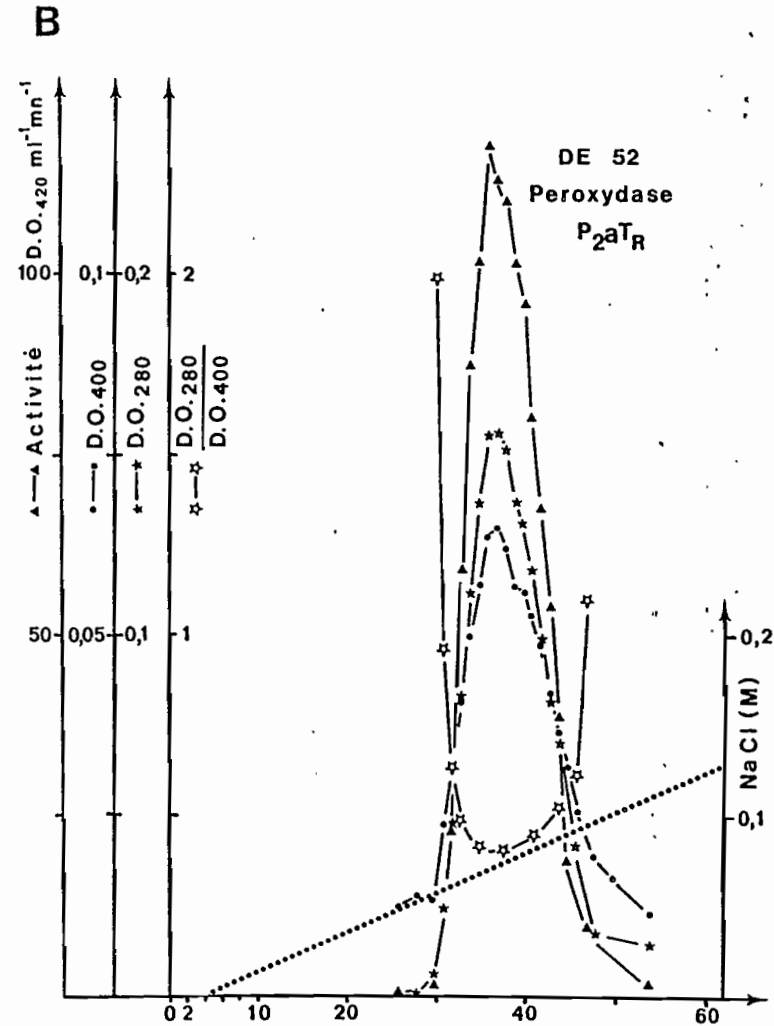
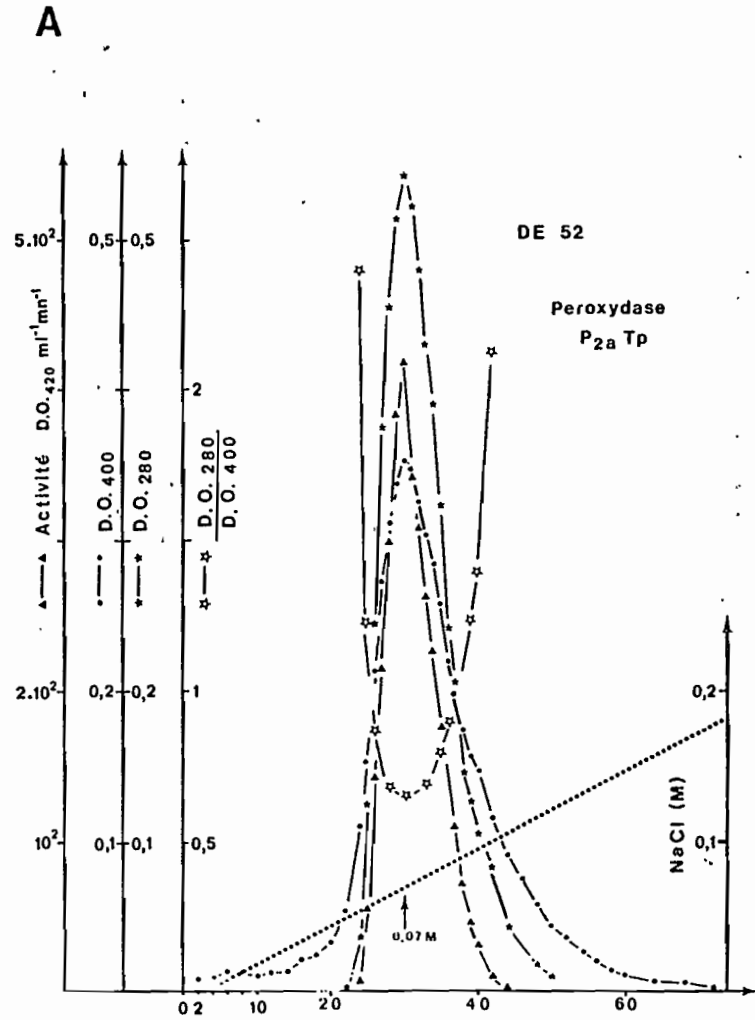
- Variations de l'activité peroxydasique de fractions autres que P2a:

La mesure des activités peroxydasiques "réelles" (et non plus relative) révèle que celle des fractions EF et P2b diminue dans les tissus SF, R et, surtout, PF et P, par rapport à l'activité initialement présente dans les tissus sains. Pour ces deux fractions l'évolution de l'activité peroxydasique est donc l'inverse de celle mise en évidence pour P2a. Le cas du pivot 13 illustre parfaitement cette situation (les activités sont exprimées en unités/g de tissu)

	TS	TSF	TPF	P	R
Extrait brut	7500	3875	67500	11000	15375
EF	5850	970	1000	0	1265
P 2a	478	1424	66500	11000	12275
P 2b	1172	1482	0	0	1835

L'effet de l'infection sur la biosynthèse des peroxydases est donc complexe: stimulation de l'enzyme P2a d'une part, répression des enzymes des fractions EF et P2b d'autre part. Concernant ces dernières, la diminution d'activité n'est cependant pas enregistrée de manière systématique. En particulier il n'est pas rare que, dans les tissus réactionnels, l'activité peroxydasique de fractions autres que P2a soit également stimulées (voir FIG.).

Figure 39 - Dernière étape de la purification des peroxydases: séparation par chromatographie sur DEAE-cellulose à pH 5. Seules les fractions présentant le rapport DO_{280}/DO_{400} le plus faible ont été rassemblées. A) P_{2a} de tissus parasités par *R. lignosus*. B) P_{2a} de tissus de réaction.



II PURIFICATION ET CARACTERISTIQUES PHYSICOCHIMIQUES DES ENZYMES P2a EXTRAITES, RESPECTIVEMENT, DE TISSUS PARASITES ET DE TISSUS DE REACTION

Nous avons vu précédemment que l'isoenzyme P2a dont l'activité augmente par suite de l'attaque parasitaire correspond à une isoenzyme homologue des tissus sains et dans les tissus de réaction. Cependant le comportement de l'isoenzyme extraite des tissus parasités présente quelques différences par rapport à ses homologues : PM apparent plus élevé (125000 au lieu de 108-110000), léger décalage au cours des migrations électrophorétiques et bande plus large. Afin de lever les incertitudes concernant l'identité des isoenzymes P2a respectivement extraites des tissus parasités et des tissus réactionnels, nous avons purifié l'isoenzyme P2a des deux provenances et avons comparé leurs caractéristiques physicochimiques.

I. PURIFICATION DES ENZYMES

Les deux purifications ont été réalisées en trois étapes les deux premières étant identiques à celles décrites pour la purification des laccases.

- "Batch" DEAE-cellulose:

Cette étape consiste en une adsorption des peroxydases sur la DEAE-cellulose (DE52) par addition de l'échangeur d'ions dans l'extrait lui-même; la DE52 est récupérée par filtration de la suspension sur verre fritté. Le cycle est renouvelé 3 à 4 fois; seules les enzymes correspondant à la fraction EF ne sont pas adsorbées.

Après le dernier cycle d'adsorption, les lots de DE52 sont collectés, lavés par un tampon phosphate de sodium 0,0125 M à pH 6 et les peroxydases sont éluées par un tampon phosphate contenant du NaCl à 0,25 M. Cette élution est renouvelée à 3 ou 4 reprises de manière à récupérer le maximum de l'activité peroxydasique préalablement fixée sur la DE52. Les solutions, appelées "Batch DE52", sont filtrées et concentrées sur ultrafiltre AMICON PM10. Cette étape intermédiaire permet à la fois de diminuer la force ionique, d'éliminer une fraction importante de la pigmentation brune de la solution originelle et

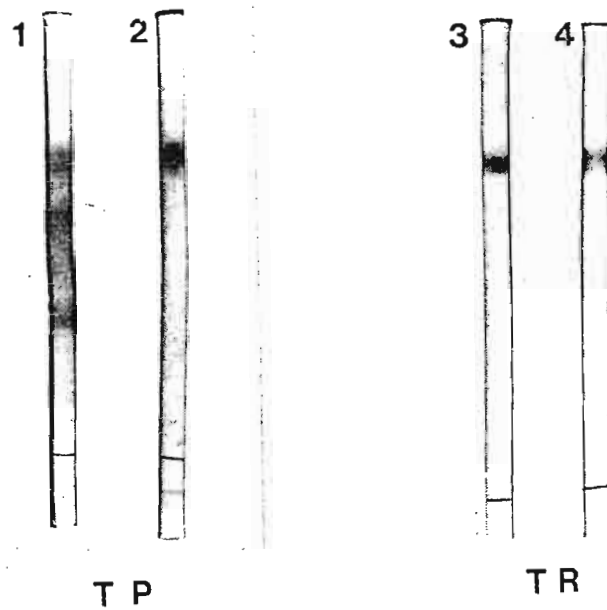
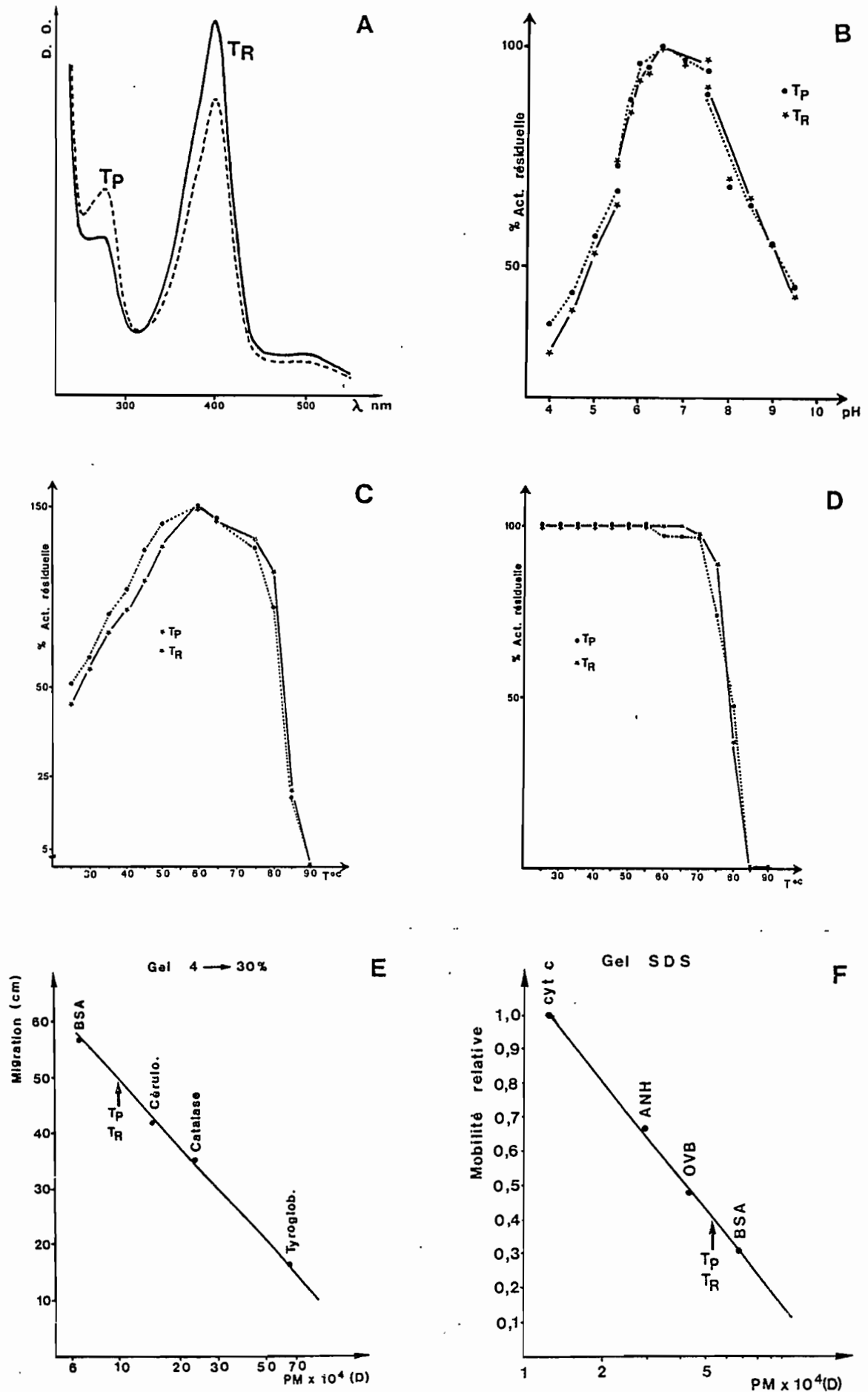


Figure 40 - Vérification, après la dernière étape de purification, de l'homogénéité des préparations de peroxydase, par électrophorèse en gel de polyacrylamide. 1: étape "batch DE52", 2: P2a purifiée à partir de tissus parasités; 3 et 4: P2a isolée à partir de tissus réactionnels. (1, 2 et 3: révélation des protéines par coloration au bleu de Coomassie; 4: révélation de la peroxydase par son activité catalytique).

Figure 41 - Détermination de quelques caractéristiques physicochimiques des peroxydases P2a (légende voir le texte p.).



d'effectuer un changement de tampon. En fin de cycle la peroxydase est recueillie dans un tampon Tris-HCl 0,025 M pH 8,4.

- Chromatographie sur colonne de DEAE-cellulose à pH 8,4

La solution "Batch-DE52" concentrée est déposée sur une colonne (d = 2 cm, h = 15 cm). L'enzyme est éluée par un gradient en NaCl (0 --> 0,35 M) dans un tampon Tris-HCl 0,025M à pH 8,4. Les fractions les plus actives sont rassemblées. Après concentration sur filtre AMICON, avec changement de tampon (acétate 0,025M à pH 5), cette solution est rechromatographiée sur une colonne de DE52 équilibrée dans ce même tampon acétate.

Cette étape permet d'écartier la majorité des protéines contenues dans la solution "Batch-DE52". Seules les fractions centrales du pic sont rassemblées. Le test d'activité révèle que dans ces conditions l'activité peroxydasique est indépendante des ions calcium. La solution enzymatique ne contient donc pas la fraction P2b.

- Chromatographie sur colonne de DEAE-cellulose à pH 5

Les figures 39 A et B présentent les diagrammes d'éluion (P2a TP et P2a TR). On remarque que pour les deux purifications il y a superposition des pics tracés à partir de :

- l'activité enzymatique
- la DO à 280 nm (protéine)
- la DO à 402 nm (hème de la peroxydase).

A l'issue de cette procédure de purification la peroxydase P2a des tissus parasités et celle des tissus réactionnels paraît homogène à l'électrophorèse (Fig. 40)

2. DETERMINATION DES PRINCIPALES CARACTERISTIQUES PHYSICOCHIMIQUES

Les caractéristiques suivantes ont été déterminées :

- PM des enzymes natives ou dénaturées par le SDS (Fig. 41 E et F)
- pH isoélectrique (voir pics majeurs Fig. 43 graphes TP et TR)
- pH optimal d'activité (Fig. 41 B)
- activité en fonction de la température (Fig. 41 C)
- stabilité thermique (10 mn à la température donnée puis test à 30°) (Fig. 41 D)
- spectre UV-visible (Fig. 41 A)

Figure 42 - Finger print tryptique des peroxydases P2a extraites respectivement des tissus parasités (TP) et des tissus de réaction (TR).

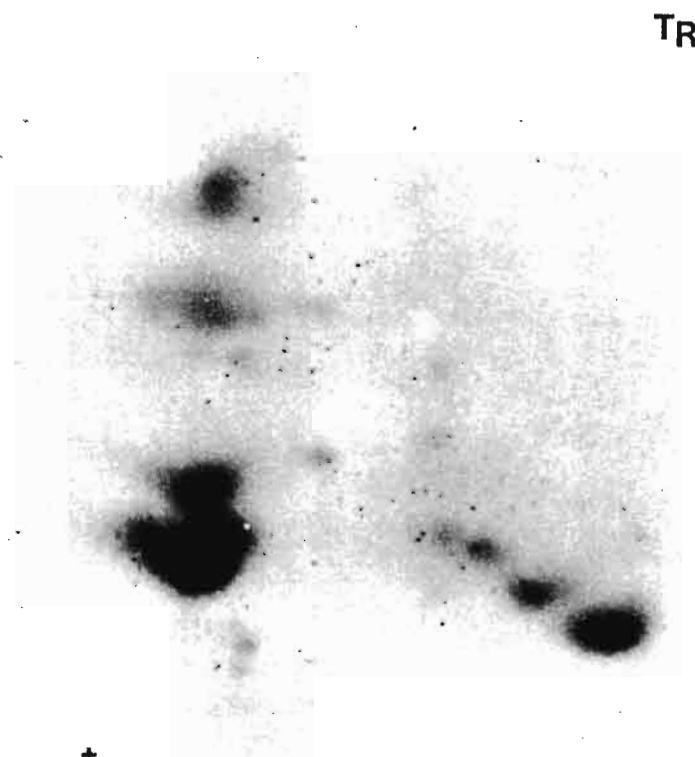
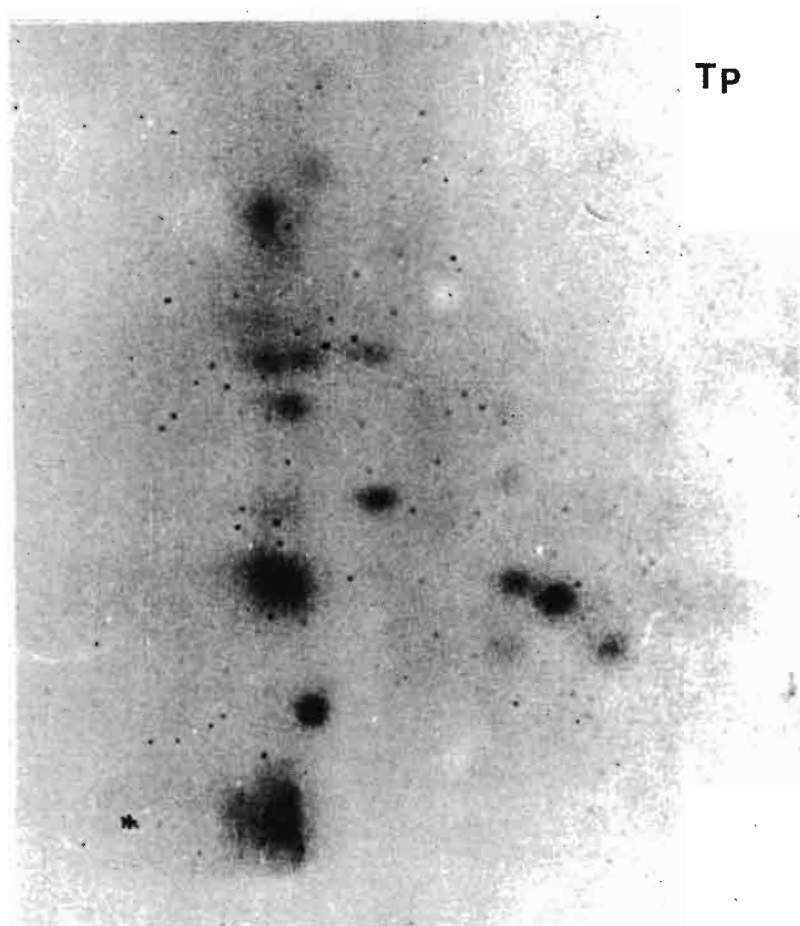


TABLEAU 13

COMPOSITION EN ACIDES AMINES DE LA PEROXYDASE P_{2a}
 ISOLEE A PARTIR DE TISSUS PARASITES PAR *R. LIGNOSUS* (TP)
 ET DE TISSUS DE REACTION (TR)

ACIDES AMINES	TP	TR
ASP	70	72
THR	47	43
SER	40	39
GLU	51	53
PRO	21	20
GLY	31	31
ALA	40	37
CYS	13	13
VAL	23	22
MET	7	6
ILEU	25	27
LEU	45	48
TYR	9	8
PHE	33	31
HIS	6	6
LYS	12	12
ARG	21	23
TRP	1	1
Total	495	492

- activité spécifique (unité par D0 à 402 nm)(Tabl. 17)
- composition en aminoacides (Tabl. 18)
- finger print trypsique (Fig. 42)

TABLEAU : 17

Caractéristiques physicochimiques

Origine de l'iso-enzyme P2a	$\frac{D0280}{D0402}$	$\frac{D0280}{D0260}$	Act. Spéc. (U/D0402)	
			Gaïacol(*)	Al. Conif.(**)
TS	2,5	0,9	453	-
TP	0,52	1,07	510	400
TR	0,34	0,94	650	335

(*) (**) respectivement à une concentration égale à $2 \cdot 10^{-2}$ M et $2 \cdot 10^{-3}$ M

Toutes ces caractéristiques, ainsi que celle relative au comportement sur DEAE-cellulose, sont communes aux deux préparations enzymatiques. Les seules variantes constatées sont une largeur de bande anormale dans le cas de l'enzyme P2a des tissus parasités, une valeur pour le rapport D0280/D0402 un peu plus élevée que celle enregistrée pour l'enzyme homologue des tissus de réaction; ces différences pourraient être attribuées, comme l'ont suggéré certains auteurs, à l'adsorption sur la protéine isolée des tissus parasités, de composés phénoliques plus ou moins oxydés qui se trouvent en quantités appréciables dans ces tissus. Ceci pourrait aussi expliquer la légère différence d'activité spécifique que nous avons notée.

Enfin les variations de composition en aminoacides ne sont pas significatives, un test de comparaison statistique (Test de Pearson) fournit un coefficient de similarité supérieur à 0,99 (1 = identité).

Les caractéristiques physicochimiques étudiées sont suffisamment voisines pour que les deux enzymes puissent être considérées comme identiques. L'enzyme native est un dimère constitué de deux sous-unités identiques de PM estimé à 54 000 D.

Une conséquence en découle: l'isoenzyme P2a est donc bien une enzyme synthétisée par l'Hévéa et l'accroissement de son activité correspond bien à une réaction de l'Hévéa en réponse à l'agression parasitaire.

d) Rôle physiologique potentiel

L'accroissement de l'activité de la peroxydase P2a étant une réaction de l'Hévéa, il convenait de déterminer sa signification: réaction de défense ou non ? L'implication de la peroxydase dans un mécanisme de défense n'est envisageable que dans la mesure où cette enzyme est capable de polymériser les monomères de la lignine.

Le tableau 17 révèle que la peroxydase P2a (TP et TR) est effectivement capable de polymériser l'alcool coniférylique (la réaction semble également positive, avec l'alcool p-coumarylique ; cependant ce substrat que nous avons préparé au laboratoire à partir de l'acide coumarique n'était pas purifié à homogénéité.

Il convient d'ajouter que toutes les fractions EF et EL, qu'elles soient extraites de tissus sains, parasités ou réactionnels, polymérisent l'alcool coniférylique. Il en ressort néanmoins que toutes les fractions sont susceptibles, sans doute à des degrés divers, de participer à la lignification des tissus. Par ailleurs ne disposant pas des trois alcools de la série cinnamique, il ne nous a pas été possible de vérifier si les différentes peroxydases possèdent une spécificité particulière à ce niveau comme cela a été démontré par le groupe d'OHGUCHI et ASADA (1975) dans le cas des isoperoxydases du radis attaqué par *Peronospora parasitica*.

III ELEMENTS DE REGULATION.

1. MECANISME PRESIDENT A L'AUGMENTATION DE L'ACTIVITE DE L'ISOPEROXYDASE P2a.

Nous avons présenté plus haut une estimation de l'importance de l'accroissement de l'activité de l'isoperoxydase P2a. Cette augmentation est considérable puisque nous avons mesuré des facteurs de stimulation de 20 à 170 selon les expériences et selon la nature des tissus (Tableau 16). Cet accroissement peut avoir deux origines différentes :

- activation de la protéine enzymatique elle-même selon un mécanisme impliquant par exemple une hydrolyse ménagée par une protéase (exp. trypsinogène \rightarrow trypsine)
- stimulation de la biosynthèse *de novo* de l'enzyme.

Les résultats relatifs à l'activité spécifique de l'isoperoxydase P2a selon les trois origines tissulaires (TS, TP et TR) (Tabl. 17) permettent d'emblée de trancher entre ces deux possibilités. En effet **les activités spécifiques** exprimées par rapport à une caractéristique fondamentale des peroxydases, la DO à 402 nm, **sont voisines** (la référence à la DO₄₀₂ nous paraissait plus judicieuse qu'une référence à une DO₂₈₀ ou une quantité de protéine (méthode de Folin ou de Lowry) car plus sensible et surtout plus fiable puisqu'elle ne tient pas compte de la présence éventuelle de contaminants protéiques (cas de l'enzyme P2a TS non purifiée de manière exhaustive). **Il en résulte que les faibles différences d'activité spécifiques ne sauraient en aucun cas rendre compte de l'accroissement considérable de l'activité de l'isoperoxydase P2a dans les tissus parasités et les tissus réactionnels.**

Il faut en conclure que cet accroissement résulte d'une stimulation de la biosynthèse de novo de la protéine enzymatique.

Il s'agit là d'une information importante pour deux raisons :

- on n'a que rarement pu démontrer de manière indiscutable l'implication d'une stimulation de la synthèse protéique dans l'augmentation de l'activité de certaines enzymes dans des tissus subissant une agression parasitaire. Dans ces cas similaires l'application des techniques sophistiquées (incorporation d'eau lourde dans les molécules (density labeling) et séparation par centrifugation en gradient de densité) a été nécessaire (DUCHESNE et al., 1977; COLLENDAVELOOL et al., 1982; 1983).

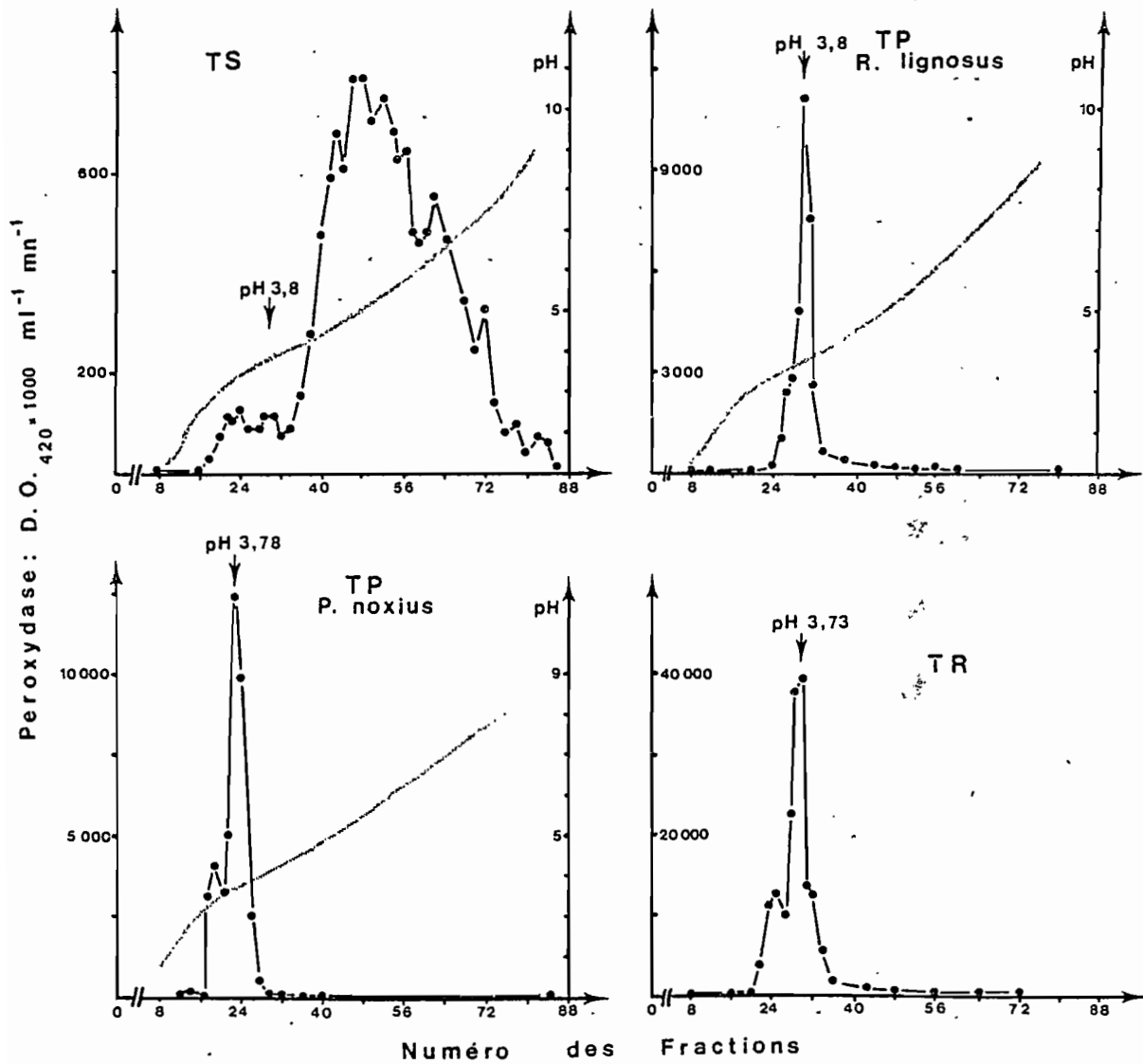
- Les résultats prouvent que les tissus du bois sont parfaitement capables de réagir, y compris lorsque la réaction implique une synthèse protéique *de novo*.

2. ASPECIFICITE AU NIVEAU DE L'AGENT PATHOGENE RESPONSABLE DE LA REACTION DE L'HEVEA.

Nous avons vu qu'au niveau du pool peroxydasique, la réaction présente une spécificité certaine puisque dans le cas de pivots adultes une seule des isoperoxydases est stimulée en priorité.

Dans la nature les racines d'Hévéa sont attaquées par de nombreux parasites. Ceux-ci provoquent-ils tous la même réaction de la part de l'hôte au

Figure 43 - Electrofocalisation en veine liquide d'extraits bruts de tissus sains (TS), parasités par *R. lignosus* et *P. noxius* et de tissus de réaction (TR); (le pic principal (TP et TR) correspond à la peroxydase P2a).



niveau du système peroxydasique? Nous avons tenté de répondre à cette question en comparant, au moyen d'une analyse par électrofocalisation en veine liquide, la composition en isoperoxydases des quatre extraits de tissus suivants: sains, réactionnels (après attaque par *S. repens*) et infectés par *R. lignosus* ou *P. noxius*.

Les diagrammes (Fig. 43) sont particulièrement démonstratifs. En effet les trois parasites provoquent la même modification du spectre isoperoxydasique caractérisée par une très nette prédominance de l'isoenzyme P2a.

La stimulation de la réaction de l'Hévée est donc aspécifique (au niveau de la cause) puisque provoquée par plusieurs parasites. Ce type de réaction présente un intérêt majeur puisque, au cas où il s'avérerait efficace, il constituerait une protection contre un ensemble de parasites.

IV. DISCUSSION

Nous avons vu, plus haut, que de nombreux auteurs ont réussi à établir une corrélation positive entre l'augmentation de l'activité peroxydasique des tissus et la lignification anormalement élevée de ces mêmes tissus. De même, une corrélation positive existe entre lignification et résistance à l'agression parasitaire. Enfin certains auteurs associent directement stimulation des peroxydases et résistance à l'infection (HISLOP et STAHMANN 1971 ; JOHNSON et CUNNINGHAM, 1972 ; RETIG, 1974 ; VEGETTI et al., 1975); en revanche d'autres n'ont pas réussi à établir une telle corrélation (GREZELINSKA, 1970; JOHANSSON et THEANDER, 1974) ou considèrent l'accroissement de l'activité peroxydasique soit comme un marqueur de sénescence (MAZEAU et ESQUERRE-TUGAYE, 1976) soit comme un marqueur de rajeunissement (BIRECKA et al., 1975).

Pour être efficace en tant que mécanisme de défense, la lignification doit intervenir dès la pénétration du parasite dans les tissus. Ceci suppose, que l'ensemble des enzymes de la voie de biosynthèse de la lignine soient stimulées suffisamment tôt, y compris la peroxydase qui réalise l'étape finale de cette biosynthèse. En fait, concernant la stimulation de l'activité peroxydasique on note, suivant les couples hôte-parasite, soit un accroissement relativement tardif de cette activité dans les tissus (au moins par rapport au délai de stimulation de la PAL ou de l'OMT ; LEGRAND et al. (1976) ; peut-être est-ce le résultat d'une induction séquentielle?), soit une induction précoce (HISLOP et STAHMANN, 1971).

Par ailleurs l'augmentation de l'activité peroxydasique est quantitativement variable (généralement 50 à 300 %) ; qualitativement, la stimulation concerne, suivant le cas, toutes ou une majorité des isoperoxydases

préexistantes dans les tissus sains (HISLOP et STAHMANN, 1971 ; SEEVERS et al., 1971; BIRECKA et al., 1975 a et b ; OHGUCHI et al., 1974 ; ASADA, 1978 ; OGHUCHI et ASADA, 1975 ; RETIG, 1974).

Par rapport à la réaction peroxydasique développée par d'autres plantes, celle de l'Hévéa présente deux caractéristiques exceptionnelles :

- **son intensité** : globalement l'augmentation de l'activité peut atteindre un facteur 10 par rapport à l'activité présente dans les tissus sains ;

- **sa spécificité (au niveau de l'effet)** puisque dans les pivots adultes la stimulation ne concerne pratiquement qu'une seule des isoperoxydases initialement présentes dans ces mêmes tissus sains, le facteur de stimulation atteignant dans le meilleur des cas étudiés un facteur = 170.

A noter, de plus, que :

- **l'induction est aspécifique, au niveau de la cause**, puisque les trois parasites étudiés provoquent la même réaction ;

- **l'accroissement de l'activité de l'isoperoxydase P2a résulte non d'une activation de la protéine enzymatique, mais de la stimulation de la biosynthèse *de novo*, par la plante, de la protéine elle-même;**

- **l'isoperoxydase est capable de réaliser l'étape finale de la biosynthèse de la lignine; elle est donc susceptible de participer à un processus de lignification réactionnel.**

CHAPITRE IV

MODALITES DE LA DEGRADATION DES TISSUS, *IN VITRO* ET *IN VIVO*, PAR *R. LIGNOSUS* ET *P. NOXIUS*.

L'**objectif**, en abordant cet aspect des recherches, était de **vérifier** la validité des hypothèses antérieurement proposées concernant :

- la **nature ligninolytique** de *P. noxius* en raison de sa capacité à excréter une laccase ;
- la **dégradation préférentielle** de la lignine par *R. lignosus*, celle de la fraction polyosidique par *P. noxius*. Ceci en raison des différences d'équipement enzymatique qu'ils présentent, au plan quantitatif ;
- l'**attaque préférentielle, *in vivo***, des tissus cellulosiques du phloème par *P. noxius*, des tissus lignifiés du xylème par *R. lignosus* en raison de ces mêmes différences.

En d'autres termes, il s'agissait de **vérifier** si les différences d'équipement enzymatique des deux agents pathogènes influaient effectivement sur leur comportement à la fois saprophytique et parasitaire.

Pour effectuer ces contrôles nous avons examiné l'effet, *in vitro* et *in vivo*, des deux champignons sur les tissus du bois. Enfin nous avons comparé les résultats de l'analyse chimique à ceux de l'observation cytologique exécutée parallèlement sur des plantules d'Hévéa inoculées artificiellement (NICOLE, 1984).

I. DEGRADATION, *IN VITRO*, DE BUCHETTES DE BOIS D'HEVEA; NATURE LIGNOLYTIQUE DE *P. NOXIUS*

1. Effet comparé de *R. lignosus*, *P. noxius* et *Antrodia sp.* sur la "perte en poids" des bûchettes et sur la dégradation de la lignine.

L'évaluation de la perte en poids, témoin de l'aptitude des champignons à utiliser ce matériau comme substrat nutritif, a été réalisée non seulement pour les deux agents pathogènes de l'Hévéa, mais également pour *Antrodia sp.*, responsable d'une pourriture brune du bois de sciage. Ce dernier a été intégré dans ces essais à titre de témoin des aptitudes dégradatives d'un agent de pourriture

Figure 44 - Dégradation de bûchettes d'Hévéa (cultures en tube de Roux) par *Antrodia sp.* (Ant.), *R. lignosus* (souches Lst et L68) et *P. noxius* (Nst). a) Perte en poids (exprimée en % de perte de matière sèche par rapport à des bûchettes non inoculées). b) Contenu en lignine (LTG) des résidus de bûchettes après des temps de culture variables.

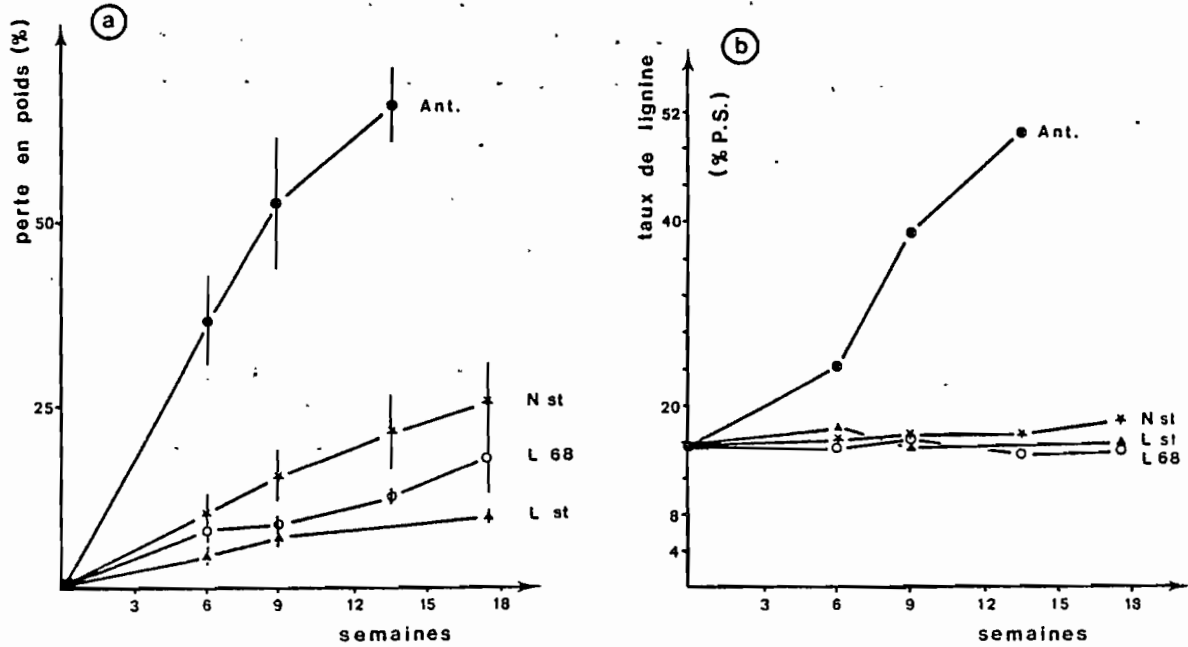
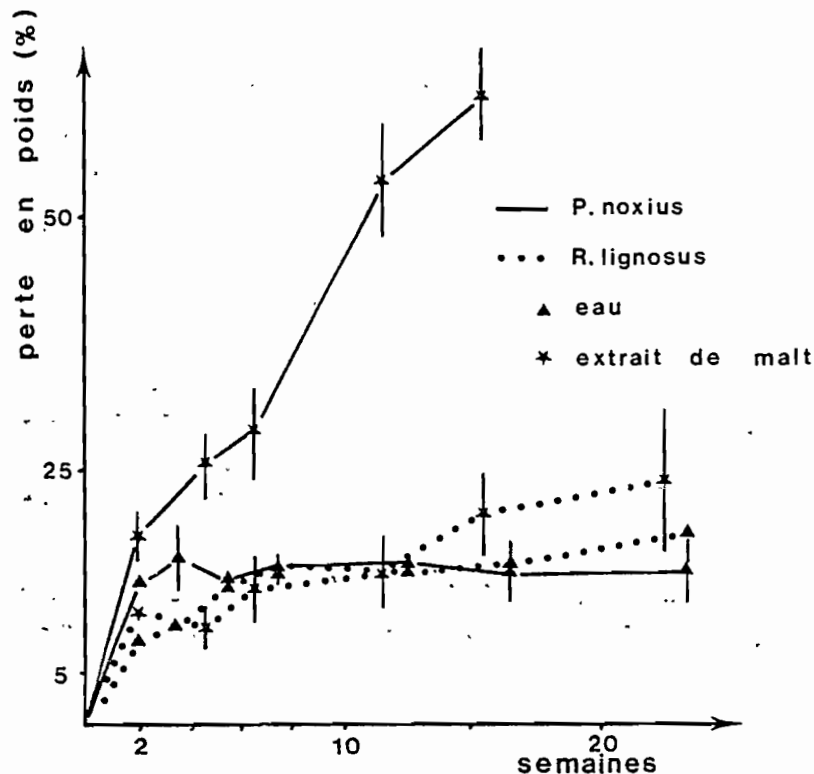


Figure 46 - Effet d'une source nutritive exogène sur l'évolution de la perte en poids de bûchettes infectées par différents champignons.



brune ; il constituera un élément de comparaison devant faciliter l'interprétation des résultats.

La figure (44 a) permet de comparer l'aptitude des différents champignons à utiliser le bois d'Hévéa. Il apparaît que l'*Antrodia* est beaucoup plus actif que la souche de *P. noxius* (N st.) qui, elle-même, possède un pouvoir dégradatif nettement supérieur à celui des deux souches de *R. lignosus* (L st et L 68). Notons que ces deux souches diffèrent entre elles par leur agressivité mesurée sur des plantules d'Hévéa inoculées artificiellement, dans des conditions décrites par ailleurs (NANDRIS et al, 1983; NICOLE et al., 1983).

Cette première approche des capacités à dégrader le bois a été complétée par l'estimation du taux de lignine présent dans les résidus de bûchettes après des temps variables de colonisation par les champignons (Fig. 44 b). A ce niveau, les résultats deviennent extrêmement démonstratifs quant à la nature de l'attaque. En effet alors que, en première approximation, le taux de lignine des bûchettes envahies par *R. lignosus* et *P. noxius* varie peu, dans le cas de l'*Antrodia*, en revanche, on note une augmentation considérable de la proportion de lignine des résidus. On peut en conclure que les deux premiers dégradent de façon relativement "équilibrée" à la fois la fraction lignine et la fraction polysaccharidique du bois, alors que *Antrodia* ne dégrade que cette dernière fraction provoquant, de ce fait même, un enrichissement en lignine du résidu de bûchette.

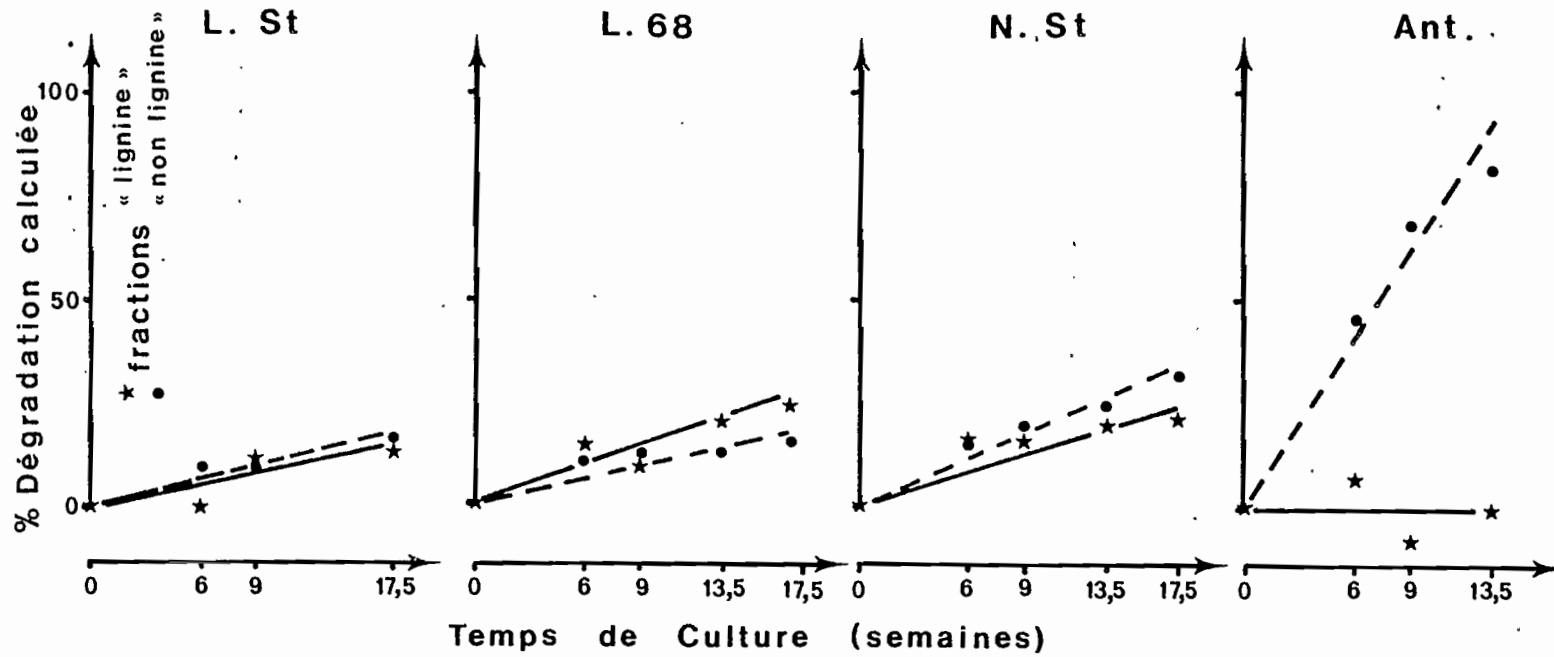
Afin de mieux mettre ce résultat en évidence, nous avons calculé, à partir des données précédentes, le taux de lignine effectivement consommé au cours de la colonisation des bûchettes et en avons déduit le taux de consommation de la fraction "non lignine" (cette fraction contient en majorité, mais non exclusivement, des polysaccharides). La figure 45 confirme les points suivants :

* *R. lignosus* et *P. noxius* dégradent effectivement la lignine. *P. noxius* doit donc être classé parmi les agents de pourriture blanche au même titre que *R. lignosus*. Ils ne sont pas des agents lignolytiques exclusifs puisqu'ils dégradent également la fraction polysaccharidique.

* *Antrodia sp.*, par contre, apparaît bien être un agent de pourriture brune, ne dépolymérisant que la fraction polysaccharidique.

* *P. noxius* montre une tendance à dégrader de façon privilégiée les polysaccharides, alors que *R. lignosus* dégrade de manière relativement équilibrée lignine et polysaccharides avec néanmoins une légère préférence pour la lignine. Ces données sont en accord avec les capacités respectives, au plan quantitatif, des deux champignons à excréter des polysaccharidases et la laccase. Comme nous l'avons vu la proportion entre hydrolases et laccases est caractéristique de chacun de ces deux parasites : prédominance de l'activité laccase chez *R. lignosus*, de l'activité des hydrolases chez *P. noxius*.

Figure 45 - Dégradation (calculée à partir des Fig 43 a et b) des fractions "lignine" et "non lignine" par les différents champignons. Les résultats sont exprimés en pourcentage de chacune de ces fractions effectivement dégradé, par référence à la quantité de matériel initialement présent dans les bûchettes (témoin).



2. Effet d'une source nutritive exogène sur l'aptitude de *R. lignosus* et *P. noxius* à dégrader le bois

Cette expérimentation a été entreprise en raison des résultats acquis pour des champignons tels que *Phanerochaete chrysosporium* et *Coriolus versicolor* révélant que la lignine ne peut être dégradée en l'absence d'un substrat nutritif tel que le glucose ou même la cellulose (KIRK et al., 1976). Ces champignons sont incapables de se développer en présence de lignine comme seule source carbonée. ANDER et ERIKSSON (1977) ont également montré que certains agents de pourriture blanche dégradent plus rapidement la fraction lignine de bûchettes de bois en présence de substrats nutritifs exogènes (tel que l'extrait de malt), qu'en l'absence d'un tel substrat.

Les essais que nous avons réalisés (pour les conditions de culture particulières, voir matériel et méthodes) révèlent que l'adjonction d'extrait de malt n'a que peu d'influence sur la vitesse de dégradation du bois par *R. lignosus* (Fig. 46). En revanche l'efficacité de *P. noxius* à dégrader les bûchettes augmente considérablement ; il n'est cependant pas possible de déterminer si cet accroissement est à mettre au compte d'une augmentation de la masse mycélienne totale envahissant le bois de la bûchette ou de celle des systèmes enzymatiques impliqués dans la dégradation des différents polymères du bois.

Quoi qu'il en soit, l'augmentation de l'aptitude à dégrader le bois s'exerce sans distinction quant à la nature des polymères. Le tableau 19 révèle en effet qu'après quatre mois de culture, en présence de milieu malté, *P. noxius* a dégradé 62 % de la bûchette (exprimé en poids de matière sèche) et 62,1 % de la fraction non lignine. Après 6 mois de culture sur bûchettes seules (en présence d'eau) la dégradation globale du bois et celle des différentes fractions est beaucoup plus limitée. Ces résultats confirment, pour *R. lignosus*, la tendance à une dégradation privilégiée de la fraction lignine; dans les conditions expérimentales utilisées ici, *P. noxius* manifeste cette même tendance. La différence de réponse de ce dernier par rapport à celle enregistrée au cours de l'essai précédent est-elle due à la différence de condition de culture?

3. Evolution de la composition monomérique de la lignine des bûchettes

Cette analyse a été entreprise dans le but de vérifier la nature de la lignine résiduelle. L'attaque fongique peut en effet se traduire soit par une dépolymérisation de la lignine sans modification de la composition monomérique du polymère résiduel, soit par une altération progressive de ce polymère tant au plan du degré de polymérisation qu'à celui de la composition monomérique.

Les résultats (Tabl. 19) montrent que la modification de la lignine est réellement progressive ; après deux semaines de culture, la chute du rapport S/V

Tableau 19 - Effet d'une source nutritive exogène sur la biodégradation des bûchettes de bois

Conditions de culture	Temps de culture (mois)	Δ PS (1)	% Lignine		Fraction "non lignine" dégradée (2)	S/V (1)
			dans résidus de bûchettes	dégradée (2)		
Témoin : bûchettes stérilisées	-	0	23,2	0	0	1,72
<i>R. lignosus</i> / bûchettes + eau	0,5 6	8,3 19,0	23,2 21,0	8,3 26,6	8,3 17,7	1,69 1,60
<i>R. lignosus</i> / bûchettes + extrait de malt	0,5 6	12,1 23,8	22,7 22,9	14,1 24,8	11,4 23,5	- 1,57
<i>P. noxius</i> / bûchettes + eau	0,5 6	14,1 14,7	22,8 22,3	16,3 18,1	13,6 13,7	1,61 1,31
<i>P. noxius</i> / bûchettes + extraits de malt	0,5 4	18,1 62,1	22,7 23,3	20,1 61,9	17,6 62,1	- 1,32

(1) Valeurs expérimentales

(2) Valeurs calculées

est à peine sensible dans le cas de *R. lignosus* (1,72 → 1,69) ; après six mois elle est nettement plus appréciable (1,60). L'action de *P. noxius* est plus rapide puisque, le rapport S/V passe de 1,72 à 1,61 dès la deuxième semaine de culture pour atteindre 1,31 après 4 mois de culture. Il est à noter que nous n'avons jamais enregistré de variation du motif p-coumarylique, le p-hydroxybenzaldéhyde (B) qui résulte de l'oxydation de ce composé par le nitrobenzène, n'est détecté qu'à l'état de traces (0,6 à 1% de la somme V+S+B).

Par ailleurs:

- l'apport nutritif exogène n'a qu'un effet négligeable sur l'évolution de S/V par rapport à celle enregistrée pour des bûchettes en l'absence de ce substrat (1,57 au lieu de 1,60 (*R. lignosus*) et 1,32 au lieu de 1,31 en cas d'infection par *P. noxius*) et ceci après respectivement 6 et 4 mois de culture ;

- l'évolution du rapport S/V est particulièrement importante

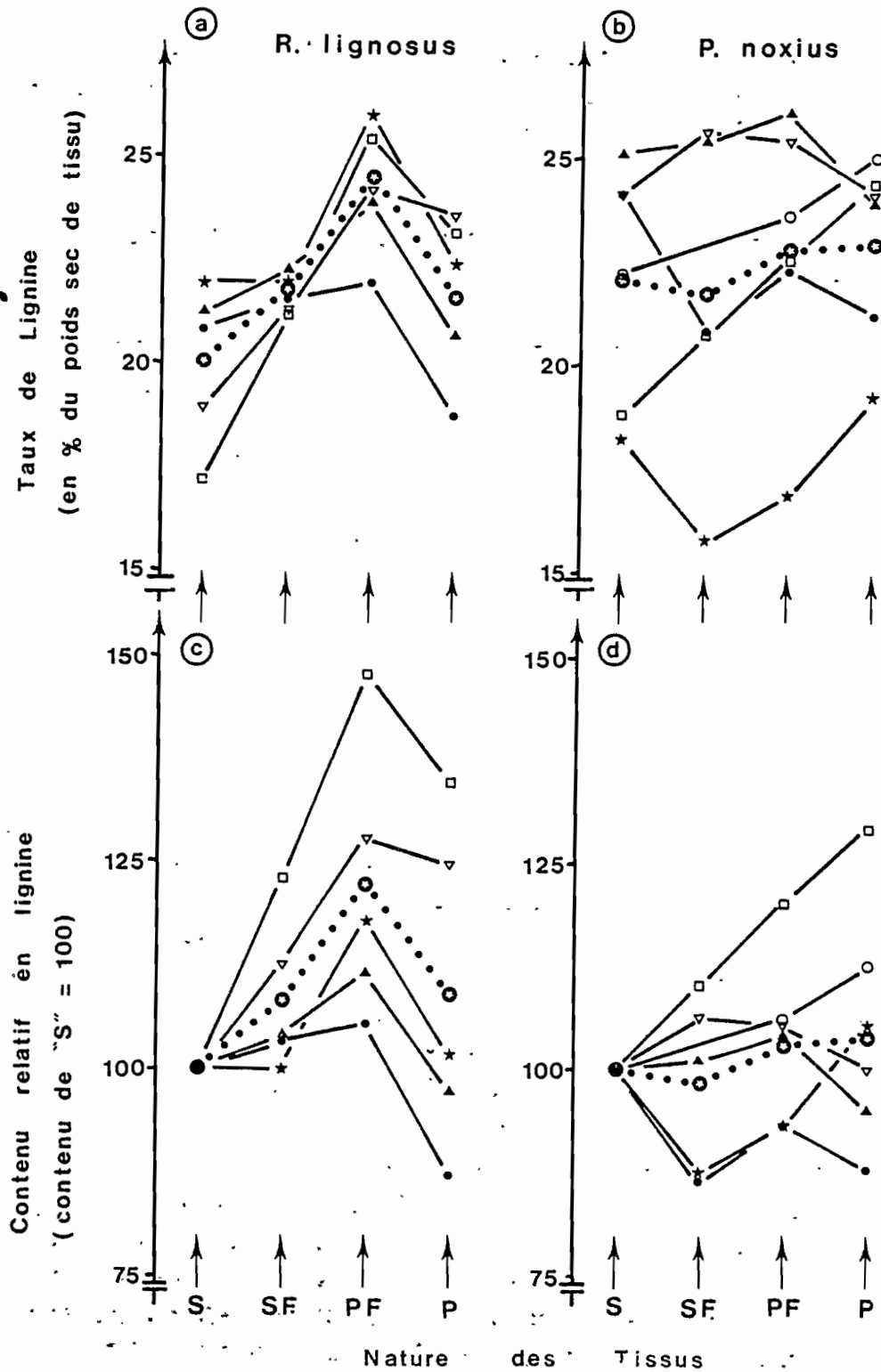
(1,61 → 1,31) entre 2 semaines et 6 mois de culture (*P. noxius*) alors que durant cette période l'évolution de la consommation en lignine apparaît comme relativement limitée (16,3 % → 18,1 %). L'évolution inverse est notée en cas de cultures de *R. lignosus* (S/V 1,69 → 1,60 ; lignine : 8,3 % → 26,6).

Ce résultat pourrait signifier que la modification de la lignine n'est pas nécessairement liée à la dépolymérisation ; elle peut en effet précéder cette dernière (cas de *P. noxius*). Il suggère également l'intervention d'au moins deux mécanismes dans la dégradation de la lignine: l'un responsable de la modification du rapport S/V, l'autre de la dépolymérisation proprement dite du polymère.

La chute du rapport S/V implique soit une élimination préférentielle du motif sinapylique de la macromolécule originelle soit une transformation chimique de cette molécule en un composé différent. A ce propos, on peut noter que la laccase de *Coriolus versicolor* est capable d'effectuer la déméthylation de l'acide et de l'alcool vanilique ainsi que de la lignine de bois d'érable moulu (ISHIHARA et MIYAZAKI, 1974 ; ISHIHARA, 1980). Cette observation peut également être corrélée au fait que les laccases de *R. lignosus* et *P. noxius* oxydent plus rapidement l'acide sinapinique que les composés de la série cinnamique (Chapitre II). Cependant si cette action déméthylante de la laccase était prédominante on comprendrait mal que la variation S/V soit plus importante dans le cas de la dégradation des tissus par *P. noxius* que dans celle de *R. lignosus*.

Une autre interprétation peut être proposée selon laquelle les champignons dégraderaient en priorité des structures pariétales riches en lignine de type sinapylique ce qui aurait pour effet de diminuer le taux de cette unité de base dans le bois infecté par rapport au taux originel du bois non inoculé.

Figure 47 - Taux de lignine dans différents types de tissus de pivots infectés par *R. lignosus* (a et c) et *P. noxius* (b et d). Chaque courbe joint les résultats enregistrés pour un pivot déterminé.



Cependant les résultats de l'observation cytologique ne sont pas en faveur d'une telle hypothèse, dans la mesure où, au niveau cellulaire, l'action des hyphes est à la fois centripète et centrifuge (NICOLE, 1984).

II. EFFET DE L'INFECTION DE PIVOTS D'HEVEA PAR *R. LIGNOSUS* ET *P. NOXIUS* SUR LE TAUX ET LA COMPOSITION MONOMERIQUE DE LA LIGNINE DES TISSUS.

1. Variations du taux de lignine dans les différents types de tissu.

L'analyse a été réalisée sur cinq pivots infectés par *R. lignosus* et six pivots attaqués par *P. noxius*. Dans chaque cas, il s'agit de pivots d'arbres adultes (4 à 8 ans), partiellement envahis, sur lesquels sont prélevés les quatre types de tissus S, SF, PF et P. Les résultats sont exprimés de deux manières, soit en taux de lignine par rapport à la sciure (séchée à 105°C) et débarassée des composés extractibles (Fig. 47 a et b), soit en pourcentages relatifs de lignine calculés, pour chaque pivot, par rapport au taux de lignine présent dans le tissu S (base 100) (Fig. 47 c et d).

Cette dernière représentation permet de mieux exprimer les variations de la teneur en lignine suivant la nature du tissu analysé.

La première remarque concerne la variabilité du taux de lignine des tissus S d'un pivot à l'autre (Fig. 47 a et b). Celle-ci peut être mise au compte soit de la variabilité génétique inter-arbres (les pivots prélevés en plantation sont issus de graines d'origines diverses), soit d'une variation dans l'exécution de la technique de dosage, d'une série d'analyses à une autre. Une telle variation introduirait des erreurs dans l'appréciation de l'évolution du taux de lignine de tissus prélevés sur un même pivot, dans les zones caractéristiques déjà précisées. Or dans le cadre de cette étude seules les variations du taux de lignine selon la nature des tissus présentent un réel intérêt.

Afin d'éliminer la source de variation éventuellement imputable à la technique de dosage, les quatre types de tissus d'un même pivot sont toujours traités au cours de la même série de dosages (épuisement en composés extractibles, dosage de la lignine, composition monomérique). L'expérience effectuée dans ces conditions sur un échantillon de sciure divisé en quatre lots subissant les traitements dans les conditions standardisées, révèle une grande homogénéité des résultats des dosages de lignine (écarts des valeurs extrêmes inférieurs à 3 % par rapport à la moyenne). Dans ces conditions, les variations enregistrées pour les différents tissus d'un même pivot sont réellement significatives.

Pour des pivots infectés par *R. lignosus*, on note en particulier et de façon systématique une augmentation parfois importante, du taux de lignine au niveau des tissus SF, suivie d'une chute de ce taux dans les zones plus anciennement colonisées par le parasite.

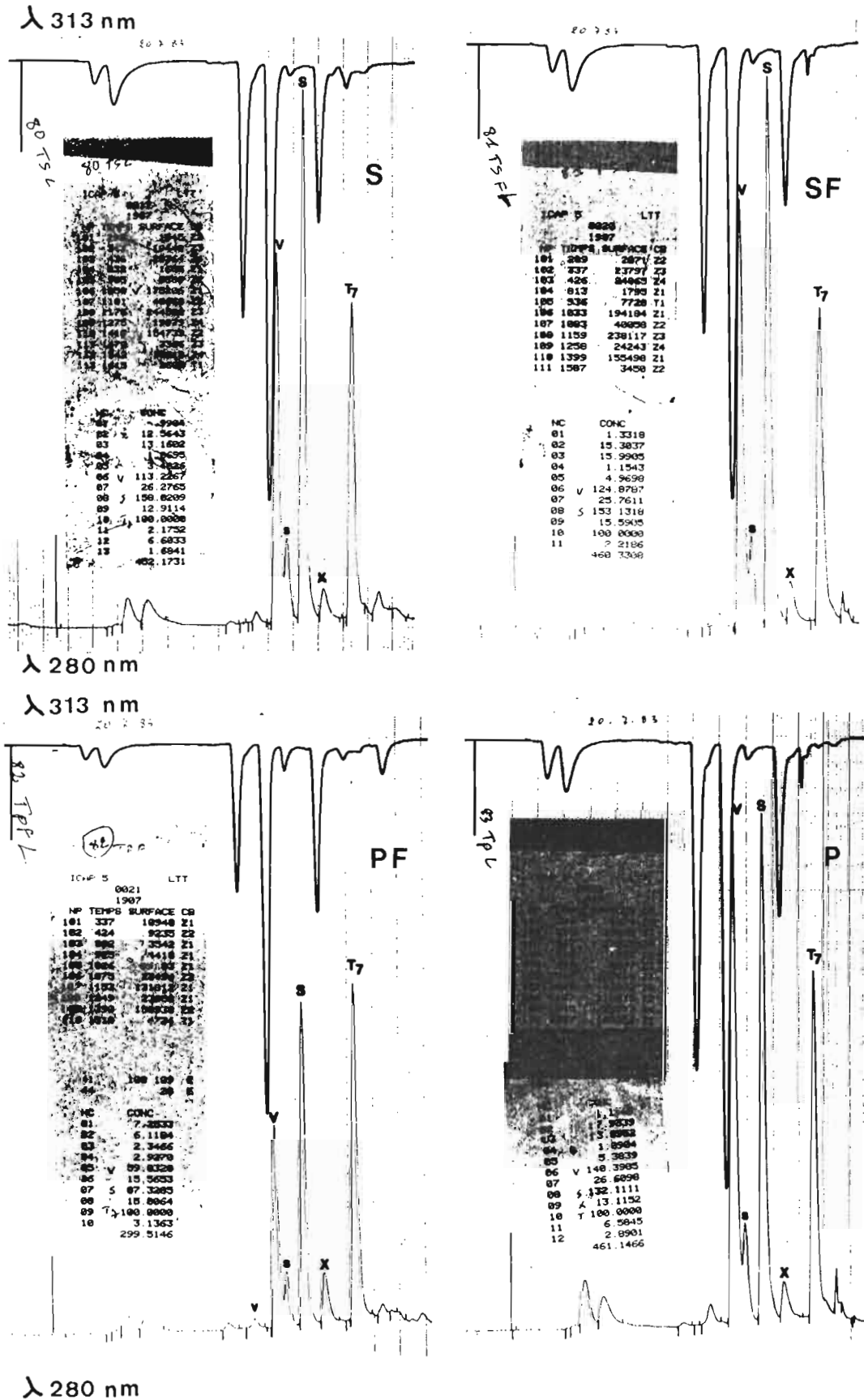
Si l'on considère l'ensemble des données enregistrées par ailleurs, notamment en ce qui concerne le très fort accroissement de l'activité peroxydasique au niveau PF, on est tenté d'attribuer cette augmentation du taux de lignine, à une lignification réactionnelle des tissus en réponse à l'agression parasitaire. Une telle réaction peut d'ailleurs être observée au niveau histologique sur jeune plantule infectée (NICOLE et al., 1982). A terme elle ne s'avère cependant pas efficace puisque dans la plupart des cas la progression intratissulaire du champignon se poursuit et la lignine qui s'était accumulée dans les tissus au stade SF, est peu à peu dégradée ; d'où la chute du taux de lignine dans les tissus de type P (Fig. 47 a et c)

L'interprétation des résultats enregistrés pour des pivots infectés par *P. noxius* est plus délicate en raison de l'hétérogénéité des réponses à l'attaque parasitaire. Toute tentative d'interprétation devra tenir compte du fait qu'au niveau anatomique les réactions de l'Hévéa ne sont qu'exceptionnelles en cas d'attaque par *P. noxius*. De même la stimulation de l'activité peroxydasique au niveau des tissus de type SF est bien moindre qu'en cas d'agression par *R. lignosus*; dans de nombreux cas l'activité dans ces tissus est même inférieure à celle des tissus sains. Ces observations conduisent à penser que *P. noxius* tue très rapidement les tissus qu'il attaque (résultat également observé en plantation (NANDRIS, 1985). Néanmoins des réactions histologiques, hyperplasie, cellules surnuméraires, et même réactions de lignification sont fréquemment observées dans les assises cellulaires situées sous les points de pénétration du champignon (infections artificielles de jeunes plantules (NICOLE et al., 1984). Ces faits sont-ils extrapolables aux pivots adultes ? Expliqueraient-ils le faible accroissement du taux de lignine au niveau SF pour certains pivots ? Dans ce cas comment expliquer la baisse du taux de lignine à ce même niveau pour deux des pivots analysés?

Si nous considérons les stades SF et P, les mêmes difficultés d'interprétation surgissent. Pour trois des pivots on enregistre un accroissement de la teneur en lignine qui pourrait être mis au compte de dégradation privilégiée de la fraction polysaccharidique des tissus (considérés comme morts). Pour d'autres pivots, on note au contraire une diminution de la teneur en ce polymère, ce qui laisse supposer une action lignolytique privilégiée. Enfin, pour le dernier pivot on assiste en principe à un équilibre dans la dégradation des différentes fractions tissulaires.

Pour rendre compte de cette hétérogénéité et considérant que les tissus de type PF et P sont morts et donc que le seul paramètre qui puisse varier est le paramètre "agent pathogène", nous proposons l'hypothèse suivante : les pivots sont attaqués par des souches de *P. noxius* se différenciant par leur aptitude physiologique à dégrader les différents polymères du bois. Cette hypothèse n'est

Figure 48 - Composition monomérique de la lignine; exemple de séparation des aldéhydes de la série benzoïque après oxydation au nitrobenzène de sciures provenant de différents types de tissus (TS, TSF, TPF et TP) d'un pivot colonisé par *R. lignosus*.



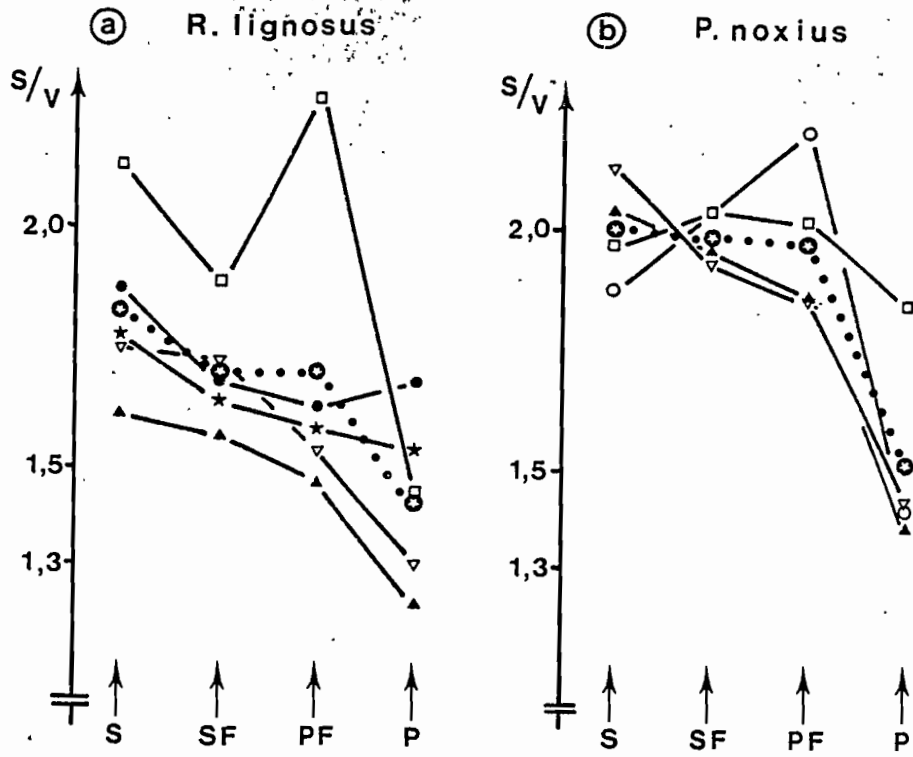


Figure 49 - Variations du rapport S/V dans différents types de tissus de pivots infectés par *R. lignosus* (a) et *P. noxius* (b) (chaque courbe joint les valeurs enregistrées pour les tissus provenant d'un même pivot).

pas gratuite : nous avons en effet pu démontrer que les populations de *P. noxius* et *R. lignosus* sont hétérogènes au plan de leur pouvoir pathogène (NANDRIS et al., 1984) ; des expériences que nous avons récemment réalisées *in vitro* révèlent que ces mêmes isolats se différencient par leur potentialité au plan de l'excrétion des enzymes.

2. Effet de l'infection sur la composition monomérique de la lignine résiduelle

Sur les échantillons de sciure provenant des différents types de tissus de pivots infectés et dont une partie aliquote a servi à l'estimation de la teneur en lignine, nous avons effectué l'analyse monomérique du polymère résiduel. Les diagrammes de la figure 48 illustrent les résultats d'une telle analyse en HPLC effectuée sur les quatre types de tissus d'un pivot infecté par *R. lignosus*.

De façon très générale, et quelle que soit la nature de l'agent pathogène infestant, nous constatons une chute du rapport S/V, importante essentiellement au niveau des tissus de type P, c'est-à-dire les plus anciennement colonisés (Fig. 49). Cette constatation recoupe celle faite *in vitro*, dans le cas de bûchettes d'Hévéa infectées. Il semblerait que les processus conduisant à la modification de la lignine, préalable à (ou accompagnant) la dégradation du polymère, soient comparables, que l'attaque par les champignons se fasse au détriment de bûchettes stérilisées ou de pivots d'Hévéa infestés naturellement. Ceci provient très vraisemblablement du fait que, dans les deux cas, les champignons agissent en saprophytes, les tissus de type P des pivots étant morts, tout comme ceux des bûchettes. Une dernière remarque concerne l'absence quasi-totale du motif p-coumarylique dans la lignine analysée, quel que soit le type de tissu dont elle provient.

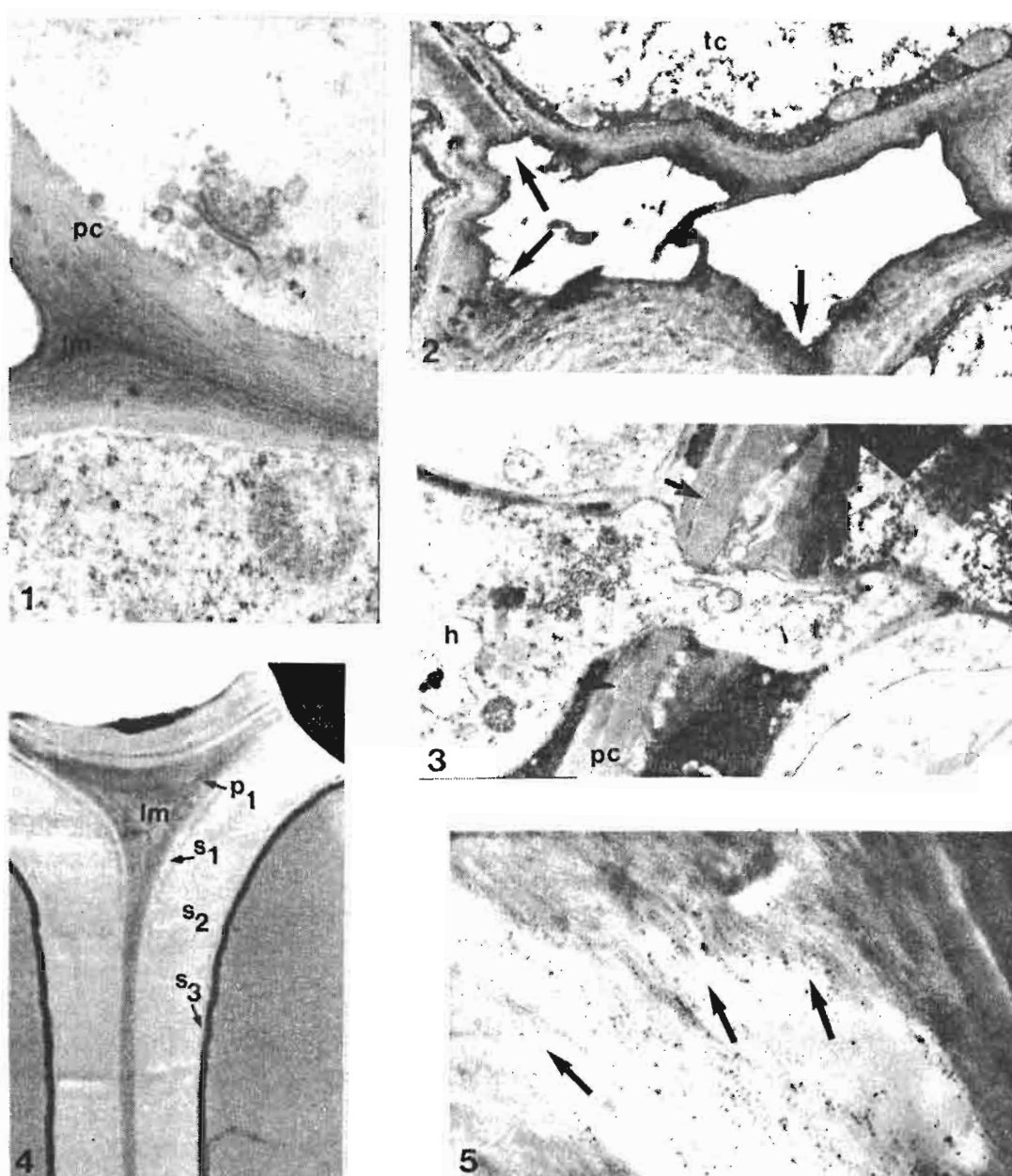
III. CONTROLES HISTOLOGIQUE ET CYTOLOGIQUE DES MODALITES DE L'INFECTION PAR *R. LIGNOSUS* ET *P. NOXIUS*

1. *IN VITRO* (bûchettes infectées)

Les observations cytologiques ont été réalisées (NICOLE, 1984) sur des coupes de bûchettes de bois infectées, donc uniquement sur des tissus ligneux.

L'attaque par les deux champignons se fait de manière anarchique et progresse à la fois dans un sens centripète : lamelle moyenne --> paroi primaire --> paroi secondaire, et centrifuge, après perforation des parois ou pénétration dans la lumière cellulaire par des punctuations : paroi secondaire (S3 --> S2 ---> S1) --> paroi primaire --> lamelle moyenne. Ainsi, *in vitro*, dans le xylème, le comportement des deux champignons ne peut être différencié.

Figure 50 - Exemples de dégradation de structures pariétales effectuée *in vivo* par les deux parasites.



1) Racine d'Hévéa sain : Coupe transversale au niveau du phloème (lm = lamelle moyenne; pc = paroi cellulosique); (x 22 500). **2)** Racine d'Hévéa parasitée par *R. lignosus*. Dégradation de la lamelle moyenne (flèches) entre deux tubes criblés (tc) du phloème. (x 6 000). **3)** Racine d'Hévéa parasitée par *R. lignosus* perforation d'une paroi cellulosique (pc) d'une cellule du parenchyme cortical primaire par une hyphes (h) en croissance. Noter l'action "corrosive" conjointe au niveau de la lamelle moyenne (flèche) (x 15 000). **4)** Racine d'Hévéa sain: coupe transversale au niveau du xylème (lm: lamelle moyenne; P1: paroi primaire; s1, s2 et s3: sous-couches de la paroi secondaire) (x 10 000). **5)** Racine d'Hévéa parasité par *P. noxius*. Altération de la lamelle moyenne et de la paroi primaire d'un vaisseau du xylème (flèches) (x 40 000). (**Observations M. NICOLE, 1984**).

2. *IN VIVO* (tissu racinaire de plantules inoculées artificiellement)

Les observations histologiques et cytologiques effectuées sur des plantules inoculées artificiellement apportent des informations extrêmement intéressantes, à plusieurs niveaux, sur le comportement parasitaire des deux agents pathogènes (La figure 50 illustre la capacité des deux parasites à dégrader certaines structures pariétales).

a) Agression parasitaire

1° Cinétique de la colonisation des tissus

Dans une plantule la proportion de tissus non lignifiés du phloème est beaucoup plus importante que dans un pivot d'arbre adulte. Ceci permet d'observer le comportement différentiel adopté par les parasites sur ces deux types de tissus.

L'observation, en fonction du temps, de l'invasion des différents tissus révèle que:

* *R. lignosus* traverse le phloème, sans s'y "attarder" et sans le dégrader entièrement, puis s'installe et colonise le xylème.

* *P. noxius*, au contraire dégrade en priorité les tissus du phloème puis attaque les tissus lignifiés du xylème.

2° Colonisation du xylème

Là encore les deux parasites présentent des comportements différents:

* *R. lignosus* adopte un cheminement essentiellement **centripète**; la dégradation débute par la lamelle moyenne et se poursuit vers l'intérieur de la cellule dégradant successivement la paroi primaire puis les sous-couches S1, S2 et S3 de la paroi secondaire.

* *P. noxius* adopte, préférentiellement, un cheminement inverse et pénètre, soit par perforation des parois, soit par les ponctuations, à l'intérieur de la cellule puis dégrade les sous-couches de la paroi secondaire (S3 --> S2 --> S1) et enfin les autres structures pariétales. A noter que d'après les tests de coloration des lignines (phloroglucine et $KMnO_4$ (coloration de Mäule) ce polymère paraît moins complètement dégradé qu'en cas d'attaque par *R. lignosus*.

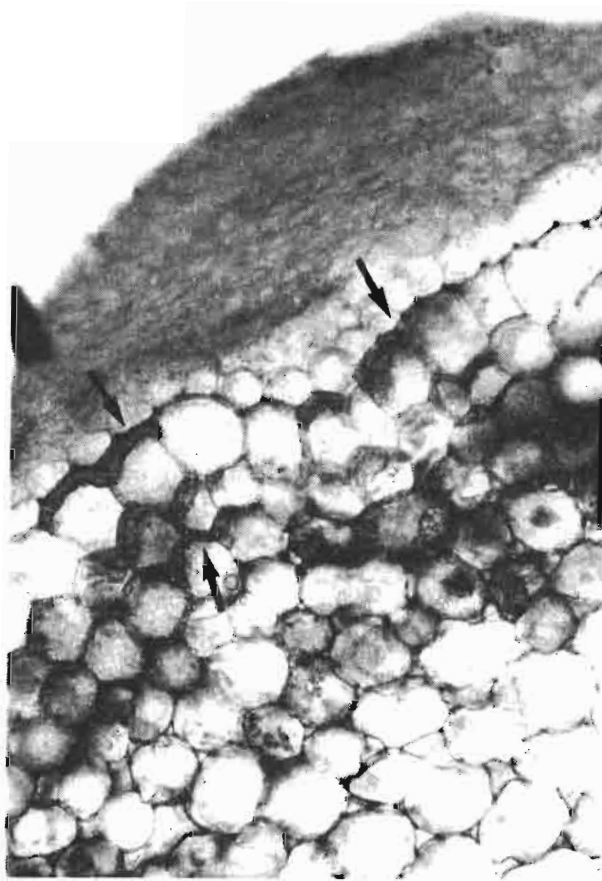


Figure 51 - Lignification réactionnelle (flèches) au niveau de parois de cellules du phloème d'une racine parasitée.

Ces différentes observations montrent que, *in vivo*, *P. noxius* **s'attaque d'abord aux tissus non lignifiés**. Les tissus du xylème, très lignifiés, sont également dégradés par ce champignon, la dégradation débutant, préférentiellement par les sous-couches les moins riches en lignine. Le comportement inverse est observé en cas d'agression par *R. lignosus*.

Ces résultats confirment les deux points essentiels :

* *R. lignosus* et *P. noxius* sont des agents lignolytiques capables de dégrader l'ensemble des polymères pariétaux et donc l'ensemble des structures tissulaires et cellulaires.

* Cependant ils présentent une spécialisation certaine, l'un, *R. lignosus*, pour les tissus ou les structures pariétales à dominante ligneuse, l'autre, *P. noxius*, pour les structures polysidiques ou à dominante polyosidique.

b) Réaction de l'hôte

Parmi les nombreuses réactions décrites, assises cellulaires surnuméraires, hyperplasie... (NICOLE et al., 1983; 1985), nous insisterons plus particulièrement sur le phénomène de lignification réactionnelle. Une telle lignification, *de novo*, a été observée au niveau des cellules parenchymateuses du phloème, donc dans un tissu normalement non lignifié.

La figure 51 montre clairement l'épaississement anormal de certaines parois cellulaires situées face au point de pénétration du parasite (ce qui suggère l'existence de phénomènes de reconnaissance et un effet topochimique pour leau "dépôt" de la lignine (activation de sites d'incrustation?). Cet épaississement est bien dû à de la lignine et non à de la subérine puisque le test de coloration à la phloroglucine est positif (coloration de la lignine et de la subérine) alors que la coloration au Soudan III B (colorant de la subérine; PURVIS et al, 1963) est négative.

IV. DISCUSSION - CONCLUSION

Au cours de cette partie des recherches il s'agissait, d'une part, de déterminer les modalités de dégradation du bois, *in vitro* (bûchettes stérilisées) et *in vivo* (pivots infectés en plantation), par *R. lignosus* et *P. noxius* et, d'autre part, de vérifier l'existence d'une corrélation entre ces données et les résultats de l'analyse enzymatique et ceux de l'observation cytologique.

Concernant le premier aspect, les résultats révèlent sans ambiguïté l'aptitude des deux champignons à dégrader la lignine. La comparaison avec le

comportement de l'*Antrodia sp.*, agent de pourriture brune, ne laisse aucun doute à ce sujet. *R. lignosus* et *P. noxius* font donc bien partie du groupe des agents responsables de pourritures blanches du bois.

Il existe néanmoins, entre ces deux champignons, des aptitudes différentes en ce qui concerne la vitesse relative avec laquelle ils dégradent les fractions majeures du bois : la lignine et les polysaccharides. *R. lignosus* manifeste une tendance à dépolymériser plus rapidement la lignine que les polysaccharides, alors que *P. noxius* marque une préférence pour cette dernière fraction; encore un tel effet n'est-il pas obtenu systématiquement. Enfin *P. noxius* "répond" mieux que *R. lignosus* à un apport nutritif exogène. Un tel apport entraîne une augmentation considérable de la vitesse de dégradation du bois, sans distinction de la nature des polymères.

Concernant l'aspect *in vivo*, des difficultés d'interprétation subsistent notamment pour rendre compte des variations du taux de lignine, suivant la nature des tissus, pour les pivots infectés par *P. noxius*. Les résultats diffèrent d'un pivot à un autre. Comme nous l'avons vu, cette variabilité pourrait être attribuée à l'existence de souches de *P. noxius* se différenciant par leurs potentialités en matière de dégradation des polymères pariétaux.

L'attaque par *R. lignosus* se traduit par une réponse beaucoup plus homogène ; en moyenne, et par rapport aux tissus sains, on note un accroissement d'environ 25 à 30 % du taux de lignine dans les tissus de type PF. Nous pensons qu'il pourrait s'agir d'une lignification réactionnelle des tissus en réponse à l'attaque parasitaire. Cet accroissement peu paraître faible comparé à celui enregistré pour les couples radis-*Peronospora parasitica* (ASADA and MATSUMOTO, 1969) et haricot-Virus de la nécrose du tabac (TNV) (KIMMINS and WUDDAH, 1977) ou tabac-VMT (MASSALA, 1981). Cependant il convient de considérer que, chez le couple hôte-parasite qui nous intéresse, les tissus qui vont être le siège de l'infection et de la lignification réactionnelle, sont déjà fortement lignifiés ce qui n'est le cas, ni pour le radis, ni pour le haricot, ni pour le tabac.

Enfin, les variations de composition monomérique de la lignine pourraient, d'après RIDE (1978), constituer une composante importante de la résistance des plantes à l'infection. Dans le cas du radis une telle modification intervient effectivement à la suite d'une attaque par *P. parasitica* (ASADA et MATSUMOTO, 1972). En revanche chez le haricot infecté par le TNV cette modification est mineure (KIMMINS et WUDDAH, 1977).

Dans le cas de l'Hévéa, l'attaque parasitaire provoque effectivement une modification du rapport S/V; elle n'est cependant particulièrement sensible qu'au niveau des tissus parasités où elle est comparable à celle intervenant *in vitro* pour des bûchettes inoculées par les champignons. Il serait donc hasardeux d'attribuer ce type de modification à une réaction de l'hôte.

Enfin les résultats de l'observation en microscopie confortent les hypothèses que nous avons proposées au cours des précédents chapitres, à savoir:

- la nature lignolytique des deux champignons;
- leur capacité à dégrader l'ensemble des structures pariétales;
- leur spécialisation relative respectivement pour les tissus à dominante ligneuse (*R. lignosus*) ou à dominante polysidique (*P. noxius*);

les deux premières caractéristiques découlent de potentialités qualitativement voisines, la troisième découle d'une différence quantitative au niveau de leur équipement respectif en enzymes extracellulaires.

CONCLUSION GENERALE

R. lignosus et *P. noxius* sont deux polyporacées polyphages, parasites facultatifs d'espèces ligneuses. L'un et l'autre attaquent l'Hévéa, l'un et l'autre dégradent le bois. Cependant ces attaques se traduisent au niveau tissulaire par des symptômes particuliers à chaque champignon, impliquant, en principe, l'intervention de mécanismes physiologiques et biochimiques spécifiques.

En abordant cette étude, limitée, pour l'essentiel, aux activités enzymatiques susceptibles de participer à la dégradation des polymères des tissus du bois, notre objectif était double:

- vérifier si les deux champignons induisent effectivement dans les tissus de l'hôte une modification de ces activités enzymatiques
- vérifier l'origine de ces activités et déterminer s'il existe une corrélation entre elles et le type de dégradation effectué par les champignons *in vitro* et *in vivo*.

Enfin, les résultats acquis au cours de ces investigations nous ont amené à approfondir les études, d'une part sur l'implication des activités enzymatiques dans la dégradation de certains polymères végétaux et, d'autre part, sur l'activité peroxydasique en relation avec les capacités de réaction de l'hôte.

La première partie de ces recherches conduit à plusieurs résultats:

* Il existe bien, au niveau des tissus parasités, une perturbation importante de plusieurs types d'activités enzymatiques: glycosidases, polyosidases, laccase et peroxydase.

* La nature de ces perturbations, mais surtout leur amplitude est spécifique de chaque parasite. Ainsi, l'attaque par *P. noxius* induit une très forte augmentation des activités hydrolytiques (glycosidases et polyosidases), alors que celle de *R. lignosus* se traduit essentiellement par l'apparition d'une activité laccase très intense. On note également, surtout lors de l'infection par *R. lignosus*, une forte stimulation de l'activité peroxydasique.

* Les études sur: l'excrétion des enzymes par les deux champignons, la répartition spatiale de ces activités au sein des pivots d'Hévéa, et, finalement, la séparation des isoenzymes par électrophorèse, montrent que, à l'exception des peroxydases, toutes les activités enzymatiques testées ont le parasite pour origine. En revanche l'accroissement de l'activité peroxydasique correspond à une réaction de l'hôte.

* Concernant les activités enzymatiques attribuées aux parasites, on note systématiquement, aussi bien *in vitro* qu'*in vivo*, la prédominance des hydrolases chez *P. noxius*, des laccases chez *R. lignosus*.

Cet ensemble de résultats nous conduit à conclure que, théoriquement, *R. lignosus* doit dégrader de manière privilégiée la fraction lignine des parois, alors que *P. noxius* dégraderait plus rapidement la fraction polyosidique. A noter que, de par sa capacité à excréter des laccases, *P. noxius* doit être

classé parmi les agents lignivores, tout comme *R. lignosus*. Enfin, et ceci nous paraît plus fondamental, au plan des processus pathogéniques, le premier devrait infester plutôt les tissus de type cellulosique, tandis que le second s'attaquerait en priorité aux tissus lignifiés du xylème.

Ces conclusions reposent sur l'hypothèse selon laquelle les enzymes que nous avons testées sont effectivement capables de dégrader les différents polymères des tissus: en particulier les polyosides et la lignine. Dans l'optique de notre démarche il était donc essentiel de conforter ces hypothèses.

Les essais réalisés *in vitro* en ce sens révèlent que les enzymes contenues dans les filtrats de culture de l'un et l'autre champignon détachent des mono- et oligosaccharides du complexe lignocellulosique naturel préparé à partir des tissus racinaires de l'Hévéa. Des expérimentations plus approfondies effectuées à l'aide de substrats spécifiques ont mis en évidence la diversité et la richesse des filtrats de culture notamment en polyosidases. Dans ce domaine, et au plan qualitatif, les deux champignons manifestent des aptitudes comparables.

Enfin des essais ont montré que la laccase L1 purifiée à partir d'un filtrat de culture de *R. lignosus*, est capable à la fois de dépolymériser la lignine et de condenser des fragments de petite taille. Nous en déduisons que pour un agent pathogène, cette enzyme constitue un témoin de son aptitude à dégrader la lignine.

De façon plus générale, les résultats de tous ces essais démontrent que les enzymes que nous avons étudiées sont réellement susceptibles de participer à l'altération des tissus de l'hôte et donc de moduler le processus pathogénique des champignons.

Les tissus de l'Hévéa ne constituent pas un substrat inerte pour *R. lignosus* et *P. noxius*; la stimulation de l'activité peroxydasique dans les tissus de la zone PF témoigne au contraire de leurs capacités de réaction. Cette stimulation est tout à fait exceptionnelle au moins à deux titres:

- son importance quantitative (l'activité totale peu décupler).
- sa relative spécificité: une seule isoenzyme est, principalement, concernée par la stimulation. Pour cette isoperoxydase le facteur de stimulation est considérable (170, dans le "meilleur" des cas étudiés) et résulte de la biosynthèse *de novo* de la protéine enzymatique. Enfin cette isoenzyme réalise la dernière étape de la biosynthèse de la lignine, elle est en effet capable de polymériser l'alcool coniférylique.

Notons également que, comme dans le cas d'autres couples hôte-parasite, l'augmentation de l'activité peroxydasique est une modification caractéristique de l'hôte et non du parasite.

A ce stade de nos recherches il convenait de confronter les hypothèses de travail (basées notamment sur la "balance" entre activités hydrolytiques et activité laccase), avec la réalité: la nature des altérations tissulaires

effectivement provoquées par les deux agents pathogènes. Cette confrontation a été opérée en deux temps:

- Une première étape a consisté à déterminer, *in vitro*, la capacité des champignons à dégrader le bois, notamment la fraction lignine. Les résultats acquis à ce niveau:

* confirment l'activité ligninolytique des deux champignons

* mettent en évidence une tendance à la spécialisation des parasites: *R. lignosus* pour la fraction lignine des parois, *P. noxius* pour la fraction polysidique. Au plan quantitatif les différences entre les deux champignons sont cependant beaucoup plus limitées que ne le laissaient prévoir les données enzymatiques.

Enfin ces mêmes essais révèlent une très forte action sur la composition monomérique de la lignine qui se traduit par une diminution sensible du rapport S/V.

- la seconde étape concerne des essais, réalisés *in vivo*, sur la détermination du taux de lignine dans différents types de tissus de pivots prélevés en plantation.

Les résultats obtenus sur les pivots infectés par *R. lignosus* sont homogènes: dans tous les cas on note une augmentation du taux de lignine dans les tissus PF (par rapport à celui des tissus sains) suivie d'une diminution de ce taux dans les tissus anciennement infestés. Une telle évolution suggère l'existence, au niveau du front de progression du parasite, d'une zone de lignification intense (cette observation est à mettre en relation avec l'accroissement considérable de l'activité peroxydasique à ce même niveau); elle confirme également l'activité ligninolytique, *in vivo*, de *R. lignosus*.

Les données acquises sur les pivots parasités par *P. noxius* sont, en revanche extrêmement variables et ne permettent pas, d'emblée, d'en tirer une conclusion cohérente; une interprétation possible consiste à admettre l'existence, au sein des populations de *P. noxius*, de souches se distinguant par leur aptitude à dégrader les différents types de polymère. Il en résulterait une dégradation privilégiée de la lignine dans certains cas, de la fraction polysidique dans d'autres.

L'existence d'une variabilité au sein des populations des parasites n'est pas une hypothèse; elle a été démontrée en ce qui concerne le pouvoir pathogène. Par ailleurs les premiers résultats d'une étude des activités enzymatiques contenues dans des extraits de bûchettes inoculées avec différents isolats des champignons ont également mis en évidence une forte variabilité à ce niveau. Cette expérimentation n'étant pas achevée, il serait cependant prématuré d'en tirer une conclusion définitive.

D'autres données ont été acquises *in vivo*, qui résultent d'observations au microscope optique et électronique de coupes de tissus prélevés sur des plantules infectées artificiellement. Ces observations révèlent que *P. noxius* attaque préférentiellement les tissus du phloème. Ces tissus une fois dégradés, le champignon poursuit son attaque au niveau du xylème. *R. lignosus*, en

revanche, s'installe très rapidement dans ce dernier. Ces résultats sont donc en accord avec les hypothèses sur l'influence de la balance entre hydrolases et laccase sur le processus parasitaire développé respectivement par les deux champignons.

Ainsi, alors que la détermination du taux de lignine fournit des données difficilement interprétables, au contraire, l'étude cytologique conduit à des conclusions dénuées d'ambiguïté. Cette différence est peut-être liée au fait que l'analyse chimique (lignines) est réalisée sur des pivots d'arbres adultes, et seulement sur la partie lignifiée de ces pivots (dans de tels pivots le phloème ne représente qu'une proportion infime des tissus) alors que l'étude cytologique est effectuée sur des pivots de jeunes plantules comportant une fraction importante de tissus de type cellulosique permettant de mettre mieux en évidence le comportement "différentiel" des deux parasites.

En résumé, il apparaît donc bien que le déroulement de la pathogénèse, et plus spécifiquement la phase de colonisation des tissus qui seule a été prise en compte au cours de cette étude, est modulée par l'activité des enzymes excrétées par les parasites.

L'observation cytologique a conduit à un autre résultat: la mise en évidence d'une lignification anormale des parois cellulaires au niveau de la zone PF. Au moins en cas d'infection par *R. lignosus*, il y a ici également accord entre cette observation et les résultats de l'analyse enzymatique (très forte stimulation de l'activité peroxydasique) et ceux de l'analyse du taux de lignine (augmentation au niveau des tissus PF).

Nous avons mentionné dans l'avant-propos que l'initiation du programme de recherche répondait, entre autres, à deux préoccupations: l'identification d'un marqueur de l'infection et celle d'un marqueur de réaction. On pouvait donc se demander dans quelle mesure les résultats acquis contribuaient à apporter une solution à ces préoccupations.

Concernant le marqueur d'infection, les études ont assez rapidement conduit à la mise au point d'un "test laccase" qui permet de déterminer si un tissu est infecté ou sain; seul les tissus infectés (par *R. lignosus*, *P. noxius* ou éventuellement un autre agent de pourriture blanche) fournit un test laccase positif. Ce test est mis en oeuvre pour vérifier la réussite des inoculations artificielles, en particulier aux premiers stades de l'infection alors que la pénétration dans les tissus est encore indécélable. D'autres activités enzymatiques pourraient jouer un rôle équivalent, elles sont cependant moins spécifiques et moins simples à mettre en oeuvre. A noter qu'un "test α -galactosidase" permettrait de plus de distinguer entre *P. noxius* et *R. lignosus*.

En pratique cet outil ne présente cependant un réel intérêt qu'au niveau du "laboratoire"; en effet les résultats des recherches sur la répartition spatiale des enzymes dans les pivots montrent que les activités enzymatiques spécifiques des parasites restent strictement cantonnées dans la zone PF et P. S'agissant d'enzymes solubles, on aurait pu penser que ces enzymes

diffuseraient en avant du front de progression des parasites et seraient détectables, au moins à l'état de traces, dans les tissus sains, en particulier dans ceux du tronc, plus facilement accessibles que ceux des racines. Ceci n'est pas le cas; ces activités ne sont pas même détectables dans le latex dans le flux draine une zone importante du tronc (ou des racines, lorsque la saignée est pratiquée au niveau du collet de l'arbre).

Concernant le marqueur de réaction, la stimulation de l'activité peroxydasique, en particulier celle de l'isoenzyme P2a, démontre clairement l'aptitude de l'Hévéa à réagir à l'agression parasitaire; L'accumulation de lignine dans la zone PF en est un autre indice. Ces réactions peuvent-elles être assimilées à des réactions de défenses à l'encontre de parasites lignivores? Si oui, force est de constater que la lignification réactionnelle est inefficace à terme, puisque dans la très grande majorité des cas les parasites poursuivent leur progression intratissulaire et finissent par tuer l'arbre. Un tel mécanisme pourrait néanmoins contribuer à conférer une certaine "tolérance" à l'arbre à condition qu'il soit induit de manière suffisamment précoce pour permettre l'édification d'une barrière capable de ralentir la progression des parasites.

Au niveau anatomique, la réaction de l'Hévéa se traduit souvent par l'hypertrophie des racines latérales, mais également par la néogénèse de tissus de réaction. Ce dernier événement est fréquent lorsque l'attaque parasitaire est opérée par *S. repens* (qui ne détruit que les tissus corticaux), rare en cas d'infection par *R. lignosus* et inexistant en cas d'atteinte par *P. noxius*. Ces tissus de réaction, contiennent une activité peroxydasique anormalement élevée, activité due principalement à l'isoenzyme P2a, la même que celle qui se trouve très fortement stimulée dans les tissus PF.

Une enquête effectuée sur le terrain, a montré qu'environ 10% des arbres, dont le pivot était réduit à l'état de moignon, comportaient de tels tissus. Par ailleurs des recensements ont montré qu'au sein d'une population d'Hévéas, un certain nombre d'individus survivaient à l'attaque parasitaire durant de nombreuses années. Une constatation analogue a été faite pour des lots de plantules infectées artificiellement. Il semblerait donc que, statistiquement, dans une population, quelques individus soient capables de "mieux" réagir que d'autres. Cette supériorité est-elle liée à une aptitude à réagir plus fortement et/ou plus précocément. La "réaction peroxydasique" peut-elle servir d'indice d'une telle aptitude? Est-il envisageable, sur ces bases, soit de sélectionner des arbres pour leur tolérance, soit de stimuler les réactions des arbres "tout venant"? Une telle stimulation permettrait-elle de modifier le "rapport des forces" en présence (agression et réaction) dont dépend, en définitive, le devenir de l'arbre: survie ou mort? Sans doute conviendrait-il de poursuivre les recherches dans cette voie afin de répondre à ces questions et ainsi contribuer, parallèlement aux méthodes chimiques de prévention explorées avec succès par l'IRCA, à une toujours meilleure protection de l'Hévéa contre les agents de pourridies: *R. lignosus* et *P. noxius*.

Les résultats présentés dans ce mémoire ont fait l'objet des publications et communications suivantes:

A - Publications:

- GEIGER, J.P.; 1975 - Aspects physiologiques et biochimiques de la spécialisation parasitaire. Cas des *Corticium rolfsii* (Sacc.) Curzi et *Leptoporus lignosus* (Kl.) Heim ex Pat. Etude *in vitro*. **Physiol. vég.**, **13 (2)**: 307-330.
- 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.; 1977 - Etude comparative des enzymes excrétées par les différents types mycéliens constitutifs du thalle de *Leptoporus lignosus* (Kl.) Heim. **C. R. Acad. Sci. Paris, Série D**, **284**: 919-922.
- GEIGER, J.P.; 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. Sci. Paris, Série D**, **284**: 1053-1056.
- NICOLE, M.; GEIGER, J.P.; NANDRIS, D.; 1982 - Aspects ultrastructuraux de la dégradation du phloème d'*Hevea brasiliensis* par *Rigidoporus lignosus*. **C. R. Acad. Sci. Paris, Série III**: 471-476.
- NICOLE, M.; GEIGER, J.P.; NANDRIS, D.; 1982 - Interactions hôte-parasite entre *Hevea brasiliensis* et les agents de la pourriture racinaire *Rigidoporus lignosus* et *Phellinus noxius* : étude Physiopathologique comparée. **Phytopath. Z.**, **105**: 311-326.
- GEIGER, J.P.; HUGUENIN, B.; NANDRIS, D.; NICOLE, M.; 1984 - Effect of an extracellular laccase of *Rigidoporus lignosus* on *Hevea brasiliensis* lignin. **Appl. Biochem. Biotechnology** (parue).
- GEIGER, J.P.; NICOLE, M.; NANDRIS, D. RIO, B.; 1985 - The aggression of *Hevea brasiliensis* by *Rigidoporus lignosus* and *Phellinus noxius* : some biochemical events. **Eur. J. For. Path.** (sous presse).
- NICOLE, M.; GEIGER, J.P.; NANDRIS, D.; 1985 - Defense reactions of *Hevea brasiliensis* to root diseases. **Eur. J. For. Path.** (sous presse).
- GEIGER, J.P.; RIO, B.; NICOLE, M.; NANDRIS, D.; - Biodegradation of *Hevea brasiliensis* wood by *Rigidoporus lignosus* and *Phellinus noxius*. **Eur. J. For. Path.** (accepté pour publication).
- GEIGER, J.P.; NICOLE, M.; NANDRIS, D.; RIO, B.; - Root rot diseases of *Hevea brasiliensis* I - Physiological and biochemical aspects of root aggression. **Eur. J. For. Path.** (accepté pour publication).
- NICOLE, M.; GEIGER, J.P.; NANDRIS D.; - Root rot diseases of *Hevea brasiliensis* II - Some host reactions. **Eur. J. For. Path.** (accepté pour publication).
- GEIGER, J.P.; HUGUENIN, B.; RIO, B.; NICOLE, M.; NANDRIS, D. - The laccases of *Rigidoporus lignosus* and *Pellinus noxius*. I - Purification and some physico-chemical properties. **Appl. Biochem. Biotechnology** (accepté pour publication).
- GEIGER, J.P.; HUGUENIN, B.; NANDRIS, D.; NICOLE, M.; - The laccases of *Rigidoporus lignosus* and *Pellinus noxius*. II - Effects on a thioglycolic lignin. **Appl. Biochem. Biotechnology**. (accepté pour publication).

B - Communications et posters présentés à des congrès ou à des colloques:

- GEIGER, J.P.; GOUJON, M.; 1977 - Effet de l'infection par le pourridié blanc sur la composition enzymatique des tissus de l'Hévéa. **13ème Coll. Soc. Fr. Phytopathologie**, (Comm.; résumé: **Ann. Phytopathologie**, 1978). Paris.
- GEIGER, J.P.; NANDRIS, D.; HUGUENIN, B.; 1978 - Metabolic changes in Hevea root tissues following infection by *Leptoporus lignosus*. **3rd Int. Cong. of Plant Pathology**, (poster; résumé: proceedings du congrès). Munich.
- GEIGER, J.P.; NANDRIS, D.; NICOLE, M.; 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*. **Coll. Int. Protection Cultures Tropicales**. (Comm.; résumé: proceedings du colloque). Lyon.
- NICOLE, M.; GEIGER, J.P.; NANDRIS, D.; HUGUENIN, B.; 1981 - Les pourridiés de l'Hévéa. III Réactions de l'Hévéa à l'infection par *Rigidoporus lignosus* et *Phellinus noxius*. **Coll. Int. Protection Cultures Tropicales**. (Comm.; résumé: proceedings du colloque). Lyon.
- GEIGER, J.P.; HUGUENIN, B.; 1981 - La peroxydase des tissus racinaires d'Hévéas parasités par *Rigidoporus lignosus*, origine et rôle physiologique potentiel. **Coll. Int. Protection Cultures Tropicales**. (Poster; résumé: proceedings du colloque). Lyon.
- GEIGER, J.P.; HUGUENIN, B.; 1981 - Action in vitro d'une laccase purifiée de *Rigidoporus lignosus* sur la lignine d'*Hevea brasiliensis*. **Coll. Int. Protection Cultures Tropicales**. (Poster; résumé: proceedings du colloque). Lyon.
- GEIGER, J.P.; NICOLE, M.; NANDRIS, D.; HUGUENIN, B.; 1983 - Comparative studies of rubber root rot caused by *Rigidoporus lignosus* and *Phellinus noxius* in the Ivory Coast: physiological, biochemical and cytological aspects of host-parasite interactions. **6th Coll. of the Int. Union For. Res., Organisation (IUFRO)**, (Poster; résumé: proceedings du colloque). Melbourne.
- GEIGER, J.P.; HUGUENIN, B.; NANDRIS, D.; NICOLE, M.; 1983 - Effect of an extracellular laccase of *Rigidoporus lignosus* on *Hevea brasiliensis* lignin. **Lignocellulose Biodegradation Conf.**, (Poster; résumé in **Appl. Biochem. Biotechnology**, 1984). Littlehampton.
- GEIGER, J.P.; NICOLE, M.; NANDRIS, D.; RIO, B.; 1984 - Mécanismes de l'agression d'*Hevea brasiliensis* par *Rigidoporus lignosus* et *Phellinus noxius*. **27ème Coll. Soc. Fr. Phytopathologie** (Comm.; résumé: **Agronomie**, 1985). Paris.
- NICOLE, M.; GEIGER, J.P.; NANDRIS, D.; 1984 - Réactions de défense d'*Hevea brasiliensis* à *Rigidoporus lignosus* et *Phellinus noxius*. **27ème Coll. Soc. Fr. Phytopathologie** (Comm.; résumé: **Agronomie**, 1985). Paris.
- GEIGER, J.P.; RIO, B.; NICOLE, M.; NANDRIS, D.; 1984 - Dégradation de la lignine d'*Hevea brasiliensis* par *Rigidoporus lignosus* et *Phellinus noxius*. **27ème Coll. Soc. Fr. Phytopathologie** (Poster; résumé: **Agronomie**, 1985). Paris.

BIBLIOGRAPHIE

- ADLER, E. ; LUNDQUIST, K. ; MISCHKE, G.E. ; 1966 - The structure and reactivity of lignin. in: Lignin structure and reactions. **Advances in Chemistry, Série 59**. GOULD, R.F. ed. American Chemical Soc. Public. pp. 22-35.
- ALBERSHEIM, P. ; ANDERSON-PRONTY, A.J. ; 1972 - Carbohydrates, proteins, cell surfaces and the biochemistry of pathogenesis. **Ann. Rev. Plant. Physiol.**, **26** : 31-52.
- ALBERSHEIM, P. ; JONES, T.M. ; ENGLISH, P.D. ; 1969 - Biochemistry of the cell wall in relation to infective process. **Ann. Rev. Phytopathology**, **7** : 171-194.
- ALMIN, E.K. ; ERIKSSON, K.E. ; PETTERSSON, B. ; 1975 - Extracellular enzyme system utilized by the fungus *Sporotrichum pulverulentum* (*Chrysosporium lignorum*) for the breakdown of cellulase. 2- Activities of five endo-1,4-glucanases towards carboxymethylcellulose. **Eur. J. Biochem.**, **51** : 207-211.
- ANDER, P. ; ERIKSSON, K.E. ; 1976 - The importance of phenol oxidase activity in lignin degradation by the white-rot fungus *Sporotrichum pulverulentum*. **Arch. Microbiol.**, **109** : 1-8.
- ANDER, P. ; ERIKSSON, K.E. ; 1977 - Selective degradation of wood components by white-rot fungi. **Physiol. Plant**, **41** : 239-248.
- ANDER, P. ; ERIKSSON, K.E. ; 1978 - Lignin degradation and utilization by micro-organisms. In : Progress in Industrial Microbiology, 14 : 1-58.
- ANDREASSON, L.E. ; BRANDEN, R. ; REINHAMMAR, B. ; 1976 - Kinetic studies of *Rhus vernifera* laccase. Evidence for multi-electron transfer and an oxygen intermediate in the reoxidation reaction. **Biochim. Biophys. Acta**, **438** : 370-379.
- ANDREASSON, L.E. ; REINHAMMAR, B. ; 1976 : Kinetic studies of *Rhus vernifera* laccase. Role of the metal center in electron transfer. **Biochim. Biophys. Acta**, **445** : 579-597.
- ANDREWS, P. ; 1964 - Estimation of the molecular weight of proteins by Sephadex gel filtration. **Biochem. J.**, **91** : 222-233.
- ASADA, Y. ; 1978 - Lignin induction in plant storage tissues with infection or injury. A pamphlet for the 3rd Int. Congress of Plant Pathology, Munich.
- ASADA, Y. ; MATSUMOTO, I. ; 1969 - Formation of lignin-like substance in the root tissues of japanese radish (*Raphanus sativus* root infected by *Peronospora parasitica*). **Physiol. Plant Pathol.**, **1** : 377-383.
- ASADA, Y. ; MATSUMOTO, I. ; 1972 - The nature of lignin obtained from downy mildew infected japanese radish root. **Phytopath. Z.**, **73** : 208-214.
- AYERS, A.R. ; AYERS, S.B. ; ERIKSSON, K.E. ; 1978 - Cellulobiose oxidase, purification and partial characterization of a hemoprotein from *Sporotrichum pulverulentum*. **Eur. J. Biochem.**, **90** : 171-181.
- BAREYRE, M.J. ; BOISSON, C. ; 1969 - Relation entre la morphogénèse de l'appareil végétatif non agrégé de *Leptoporus lignosus* (Kl.) Heim et le métabolisme respiratoire des filaments caractéristiques des deux phases du développement. **C.R.Acad. Sci. Paris, D**, **268** : 2256-2259.
- BARTHE, J.P. ; CANTENYS, D. ; TOUZE, A. ; 1981 - Purification and characterization of two polygalacturonases secreted by *Colletotrichum lindamuthianum*. **Phytopath. Z.**, **100** : 162-171.
- BATEMAN, D.F. ; 1968 - The enzymatic maceration of plant tissue. **Neth. J. Pl. Pathol.**, **75** : 67-80.
- BATEMAN, D.F. ; MILLAR, R.L. ; 1966 - Pectic enzymes in tissue degradation. **Ann. Rev. Phytopath.**, **4** : 119-146.

- BAVENDAMM, W. ; 1928 - Über das Vorkommen und den Nachweis von Oxydasen bei holzerstörenden Pilzen. I - **Mitteilung. Z. Pflanzenk. Pflanzenschutz**, **38** : 257-276.
- BELDMAN, G. ; SEARLE-VAN LEEUWEN, M.F. ; ROMBOUTS, F.M. ; VORAGEN, F.G.J. ; 1985 - Purification, characterization and comparison of all detectable endoglucanases, exoglucanases and β -glucosidases. **Eur. J. Biochem.**, **146** : 301-308.
- BES, B. ; RANJEVA, R. BOUDET, A.M. ; 1983 - Evidence for the involvement of activated oxygen in fungal degradation of lignocellulose. **Biochimie**, **65** : 283-289.
- BIRECKA, H. ; CATALFAMO J.L. ; GARRAWAY, M.O. ; 1975a - Cell wall and protoplast isoperoxidases of corn leaves in relation to cut injury and infection with *Helmonthosporium maydis*. **Plant. Physiol.**, **55** : 607-610.
- BIRECKA, H. ; CATALFAMO, J.L. ; URBAN, P. ; 1975b - Cell wall and protoplast isoperoxidases in tobacco plants in relation to mechanical injury and infection with Tobacco Mosaic Virus. **Plant. Physiol.**, **55** : 611-619.
- BJORNDAL, H. ; ERIKSSON, K.E. ; 1968 - Extracellular enzyme system utilized by the rot fungus *Stereum sanguinolentum* for the breakdown of cellulose. III-Characterization of two purified cellulase fractions. **Arch. Biochem. Biophys.**, **124** : 149-153.
- BLAICH, R. ; ESSER, K. 1975 - Function of enzymes in wood destroying fungi. II - Multiple forms of laccase in white rot fungi. **Arch. Microbiol.**, **103** : 271-277.
- BOCKS, S.M. ; 1967 - Fungal metabolism.- II. Studies on the formation and activity of p-diphénol oxidase (laccase). **Phytochemistry**, **6** : 777-783.
- BOISSON, C. ; 1968a - Mise en évidence de deux phases mécyliennes successives au cours du développement du *Leptoporus lignosus* (Kl.) Heim. **C.R. Acad. Sci. Paris, D**, **266** : 1112-1115.
- BOISSON, C. ; 1968b - Constitution et évolution du thalle du *Leptoporus lignosus* (Kl.) Heim. Relation entre les formes mycéliennes et la différenciation des rhizomorphes. **Agr. Trop.**, **12** : 1328-1333.
- BOISSON, C. ; 1968c - Morphogénèse des structures agrégées de l'appareil végétatif du *Leptoporus lignosus* (Kl.) Heim. **C.R. Acad. Sci. Paris, D**, **267** : 1578-1581.
- BOISSON, C. ; 1972 - Etude de la formation des rhizomorphes du *Leptoporus lignosus* (Kl.) Heim : le déterminisme de l'agrégation des filaments en plaquettes. **C.R. Acad. Sci. Paris, D**, **274** : 2481-2484.
- BOUYCHOU, J.G., 1954 - Manuel du planteur d'Hévéa. Tome I : Culture - Exploitation. **Document IFC-IRCI**, multigr., 150 p.
- BRAUNS, F.E. ; BRAUNS, D.A. ; 1960 - The physical properties of lignins. In : The chemistry of lignin. BRAUNS, F.E. ; BRAUNS, D.A. Eds, Acad. Press, New York, London, pp. 173-226.
- BRZOWSKA-HANOWER, J. ; HANOWER, P. ; LIORET, C. ; 1978 - Etude du mécanisme de la coagulation du latex d'*Hevea brasiliensis* (Kunth.) Müll. Arg. - II. Systèmes enzymatiques impliqués dans le processus. - I. Phénols oxydases. **Physiol. Vég.** **16 (2)** : 231-254.
- BUCHT, B. ; ERIKSSON, K.E. ; 1968 - Extracellular enzyme utilized by the rot fungus *Stereum sanguinolentum* for the breakdown of cellulose. I. Studies on the enzyme production. **Arch. Biochem. Biophys.**, **124** : 135-141.
- BUCHT, B. ; ERIKSSON, K.E. ; 1969 - Extracellular enzyme system utilized by the rot fungus *Stereum sanguinolentum* for the breakdown of cellulose. IV. Separation of cellobiase and aryl- β -glucosidase activities. **Arch. Biochem. Biophys.**, **129** : 416-420.
- BYRDE, R.J.W. ; 1982 - Fungal "pectinases" from ribosome to plant cell wall. **Trans. Br. Mycol. Soc.** **79, (1)** : 1-14.
- CANEVASCINI, G. ; COUDRAY, M.R. ; REY, J.P. ; SOUTHGATE, R.J.G. ; MEIER, H. ; 1979 - Induction and catabolite repression of cellulase synthesis in the thermophilic fungus *Sparotrichum thermophile*. **J. Gene. Microbiol.**, **110** : 291-303.
- CANTENYS, D. ; BARTHE, J.P. ; 1979 - Etude comparée des polygalacturonases extracellulaires et des polygalacturonases "de surface" produites, *in vitro*, par *Colletotrichum lindemuthianum*. **C.R. Acad. Sci., Paris, 2891, D** : 1183-1186.
- CERNY, G. ; 1973 - Hemmung einiger Ektoenzyme von *Fomes annosus* (Fr.), CKe. durch Holz- und Basextrakte aus *Pinus abies* (Karst.). **Eur. J. For. Path.**, **3** : 214-220.

- CHEVEAUGEON, J. ; 1959 - Le problème des pourridiés en Côte d'Ivoire. **Rev. Mycologie**, **XXIV**, 1: 39-58.
- CHRESTIN, H. ; 1984 - Le compartiment vacuo-lysosomal (les litoïdes) du latex d'*Hevea brasiliensis*: le rôle dans le maintien de l'homéostasie et dans les processus de sénescence des cellules laticifères. **Thèse Doct. d'Etat, Univ. Sci. et Tech. du Languedoc**, Montpellier.
- COLAS, B.; ATTIAS, J., 1975: Caractérisation de quelques activités hydrolasiques du suc digestif d'*Achatina balteata*. **Biochimie**, **57**: 1019 - 1027.
- COLLENDAYELLOO, J. ; LEGRAND, M. ; FRITIG, B. ; 1982 - Plant disease and regulation of enzymes involved in lignification. De novo synthesis controls O-methyltransferase activity in hypersensitive tobacco leaves infected by tobacco mosaic virus. **Physiol. Plant Pathol.**, **21** : 271-281.
- COLLENDAYELLOO, J. ; LEGRAND, M. ; FRITIG, B. ; 1983 - Plant disease and the regulation of enzymes involved in lignification. Increased rate of *de novo* synthesis of the three tobacco O-methyltransferases during the hypersensitive response to infection by tobacco mosaic virus. **Plant Physiol.**, **73** : 550-554.
- CORNER, E.J.H., 1932 - The identification of the Broum root fungus. **Garden's Bull. Straits Settl.**, **5**: 317-350.
- DAVIS, B.J. ; 1964 - Disc electrophoresis. II - Method and application to human serum proteins. **Ann. New York Acad. Sci.**, **121** : 404-427.
- De BARY, A., 1886 - Über einige Sclerotinien und Sclerotien-Krankheiten. **Bot. Zeitung**, **44** : 376-480.
- DECLERT, C. ; 1960 - Une technique de détection des agents de pourridié : la bûchette-piège. Son application à l'étude du *Leptoporus lignosus*. **Rev. Mycol.**, **26** : 119-127.
- DELGERT, C. ; NANDRIS, D ; 1981 - Attaque de fruits d'*Hévéa* avant maturité par *Phytophthora palmivora*. **Proced. Coll. Int. Protect. Cultures tropicales**. Lyon, Promolyon Ed.
- DIJKMAN, M.J., 1951 - *Hevea*: Thirty years of research in the Far East. Ed. **University of Miami Press**, Coral Gables, Florida. pp. 329.
- DOUX-GAYAT, A. ; AURIOL, P. ; JOSELEAU, J.P. ; TOUZE, A. ; 1978 - Degradation of musk melon cell wall by the xylanase of *Colletotrichum lagenarium*. **Physiol. Plant.**, **42** : 301-306.
- DUBERNET, M. ; RIBEREAU-GAYON, P. ; LERNER, H. R. ; HAREL, E. ; MAYER, A.M. ; 1977 - Purification and properties of laccase from *Botrytis cinerea*. **Phytochemistry**, **16** : 191-193.
- DUCHESNE, M ; FRITIG, B ; HIRTH, L. ; 1977 - Phenylalanine ammonia-lyase in tobacco-mosaic virus infected hypersensitive tobacco. Density labelling evidence of *de novo* synthesis. **Biochim. Biophys. Acta**, 465-481.
- ELGERSMA, D.M. ; 1976 - Production of pectic and cellulolytic enzymes by aggressive and non-aggressive strains of *Ophiostoma ulmi*. **Neth. Plant Path.**, **82**: 161-172.
- ENGLISH, P.D. ; ALBERSHEIM, P. ; 1969 - Host-pathogen interactions. I - A correlation between α -galactosidase production and virulence. **Plant Physiol.**, **44**: 217-224.
- ERIKSSON, K.E. ; 1981a - Fungal degradation of wood components. **Pure and Appl. Chem.**, **53**: 33-43.
- ERIKSSON, K.E., 1981b - Microbial degradation of cellulose and lignin. In: **The Ekman-Days 1981, Int. Symp. on Wood and Pulping Chemistry**, Stockholm ; Biosynthesis and biodegradation of wood components. Vol. 3: 60-65.
- ERIKSSON, K.E. ; GOODELL, E.W. ; 1974 - Pleiotropic mutants of the wood-rotting fungus *Polyporus adustus*, lacking cellulase, mannanase and xylanase. **Can. J. Microbiol.**, **20**: 371-378.
- ERIKSSON, K.E. ; PETERSSON, B. ; 1968a - Extracellular enzyme system utilized by the fungus *Chrysosporium lignorum* for the breakdown of cellulose. II. Purification of the cellulase. **Arch. Biochem. Biophys.**, **124**: 142-148.
- ERIKSSON, K.E. ; PETERSSON, G. ; 1968b - Studies on cellulolytic enzymes. V. Some structural properties of the cellulase from *Penicillium notatum*. **Arch. Biochem. Biophys.**, **124**: 160-166.
- ERIKSSON, K.E. ; PETERSSON, B. ; 1975a - Extracellular enzyme system utilized by the fungus *Sporotrichum pulverulentum* (*Chrysosporium lignorum*) for the breakdown of

- cellulose. 1. Separation, purification and physico-chemical characterization of five endo-1,4-glucanases. **Eur. J. Biochem.**, **51**: 193-206.
- ERIKSSON, K.E. ; PETERSSON, G. ; 1975b - Extracellular enzyme system utilized by the fungus *Sporotrichum pulverulentum* (*Chrysosporium lignorum*) for the breakdown of cellulose. 3. Purification and Physico-chemical characterization of an Exo-1,4- β -glucanase. **Eur. J. Biochem.**, **51** : 213-218.
- ERIKSSON, K.E. ; RZEDOWSKI, W. ; 1969a - Extracellular enzyme system utilized by the fungus *Chrysosporium lignorum* for the breakdown of cellulose. I. Studies on the enzyme production. **Arch. Biochem. Biophys.**, **129** : 683-688.
- ERIKSSON, K.E. ; RZEDOWSKI, W. ; 1969b - Extracellular enzyme system utilized by the fungus *Chrysosporium lignorum* for the breakdown of cellulose. II. Separation and characterization of three cellulase peaks. **Arch. Biochem. Biophys.**, **129** : 689-695.
- ESQUERRE-TUGAYE, M.T. ; 1972 - Activité protéolytique et pathogénèse dans l'antracnose du melon. **Ann. Phytopathologie**, **4 (3)** : 277-284.
- EVANS, C.S. ; PALMER, J.M. , 1984 - Extracellular oxidases purified from *Coriarius versicolor*. **Appl. Biochem. Biotechnol.** , **9** : 353-354.
- FAHRAEUS, G. ; LINDEBERG, G. ; 1953 - Influence of tyrosine and some other substances on laccase formation in *Polyporus* species. **Physiol. Plantarum**, **6** : 150-158.
- FAHRAEUS, G. ; REINHAMMAR, B. ; 1967 - Large scale production and purification of laccase from culture of the fungus *Polyporus versicolor* and some properties of laccase A. **Acta Chem. Scand.**, **21** : 2367-2378.
- FAISON, B.D. ; KIRK, T.K. ; 1983 - Relationship between lignin degradation and production of reduced oxygen species by *Phanerochaete chrysosporium*. **Appl. Env. Microbiology**, **46** : 1140-1145.
- FIDALGO, O. ; 1968 - *Phellinus pachyphloeus* and its allies. **Memoirs of the New York Bot. Garden**, **17 (2)** : 109-147.
- FRIEND, J. ; REYNOLDS, S.B. ; AVEYARD, M.A. , 1973 : Phenylalanine ammonia lyase, chlorogenic acid and lignin in potato tuber tissue inoculated with *Phytophthora infestans*. **Phytopathol. Z.**, **81** : 56-64.
- FRITIG, B. ; LEGRAND, M. ; GOSSE, J. ; HIRTH, L. ; 1973 - Changes in phenylalanine ammonia lyase during the hypersensitive reaction of tobacco to TMV. , **Virology**, **55** : 371-379.
- GADD, O. ; 1957 - Wood decay resulting from rot fungi. **Papper och Trä**, **8** : 363-373.
- GASCOIGNE, J.A. ; GASCOIGNE, M.M. ; 1960 : Biological degradation of cellulose". BUTHERWORTHS, London.
- GEIGER, J.P. ; 1975 - Aspects physiologiques et biochimiques de la spécialisation parasitaire. Cas des *Corticium rolszii* (Sacc.) Curzi et *Leptoporus lignosus* (Kl.) Heim ex Patm. Etudes *in vitro*. **Physiol. Vég.**, **14**, **2** : 307-330.
- GEIGER, J.P. ; 1977 - Etude comparative des enzymes excrétées par les différents types mycéliens constitutifs du thalle de *Leptoporus lignosus* (Kl.) Heim. **C.R. Acad. Sci. Paris, D**; **284** : 919-922.
- GEIGER, J.P. ; NANDRIS, D. ; GOUJON, M. ; 1976 - Activité des laccases et des peroxydases au sein de racines d'Hévéa attaquées par le pourridié blanc (*Leptoporus lignosus* (Kl.) Heim). **Physiol. Vég.**, **14** : 271-282.
- GEIGER, J.P. ; NICOLE, M. ; NANDRIS, D. ; RIO, B. ; 1984 - Mécanismes de l'agression d'Hevea brasiliensis par *Rigidoporus lignosus* et *Phellinus noxius*. **Proceed. 27ème Coll. Soc. Fr. Phytopathologie**, Paris: 12.
- GEIGER, J.P. ; RIO, B. ; NICOLE, M. ; NANDRIS, D. ; 1984 - Dégradation de la lignine d'Hevea brasiliensis par *Rigidoporus lignosus* et *Phellinus noxius*. **Proceed. 27ème Coll. Soc. Fr. Phytopathologie** : 28.
- GEIGER, J.P. ; NICOLE, M. ; NANDRIS, D. ; RIO, B. ; 1985 - Root rot diseases of *Hevea brasiliensis*. I. Physiological and biochemical aspects of host aggression. (Accepted for publication in: **Eur. J. For. Path.**).
- GIERER, J. ; OPARA, A.E. ; 1973 - Studies on the enzymatic degradation of lignin. The action of peroxidase

- and laccase on monomeric and dimeric model compounds. **Acta Chem. Scand.**, **27** : 2909-2922.
- GLENN, J.K. ; MORGAN, M.A. ; MAYFIELD, M.B. KUWAHARA, M. ; COLD, M.H. ; 1983 - An extracellular H₂O₂ - requiring enzyme preparation involved in lignin biodegradation by the whiterot basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. **Biochim. Biophys. Res. Comm.**, **114** : 1077-1083.
- GHOSE, T.K. ; MONTENECOURT, B.S. ; EVELEIGH D;E; ; 1981 - Measure of cellulose activity (substrates, assays, activities and recommendations) (document préparatoire pour la Commission de Biotechnologie, Int. Union of Pure and Appl. Chemistry).
- GOLD, M.H. ; KUWAHARA, M. ; CHIU, A.A. ; GLENN, J.K. ; 1984 - Purification and characterization of an extracellular H₂O₂-requiring diarylpropan oxygenase from the white-rot basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. **Arch. Biochem. Biophys.**, **234** : 353-362.
- GOLDSCHMID, O. ; 1971 - Ultraviolet spectra. In : **Lignins, occurrence, formation structure and reactions**. SARKANEN, K.V. ; LUDWIG, C.H. eds. Wiley-interscience New York, pp. 241-266.
- GRABBE, K. ; KOENIG, R. ; HAIDER, K. ; 1968 - Die Bildung der Phenoloxdase und die Stoffwechselbeeinflussung durch Phenole bei *Polystictus versicolor*. **Arch. Microbiol.**, **63** : 133-153.
- GREEN, N.E. ; HADWIGER, L.A. ; GRAHAM, S.O., 1975 - Phenylalanine ammonia-lyase, tyrosine ammonia-lyase, and lignin in wheat inoculated with *Erysiphe graminis* f. sp. *tritici*. **Phytopathology**, **65** : 1071-1074.
- GRISEBACH, H ; 1977 - Biochemistry of lignification. **Naturwissenschaften**, **64** : 619-625.
- GROSS, G.G. ; 1977 - Biosynthesis of lignin and related monomers. In : **Recent Adv. Phytochem.**, **11** : 141-184.
- GRZELINSKA, A. ; 1970 - Peroxidase isoenzymes in *Fusarium* - infected tomato plants. **Phytopath. Z.**, **69** : 212-222.
- HAARS, A. ; HÜTTERMANN, A. ; 1980a - Macromolecular mechanism of lignin degradation by *Fomes annosus*. **Naturwissenschaften**, **67** : 39-40.
- HAARS, A. ; HÜTTERMANN, A. ; 1980b - Function of laccase in the white-rot fungus *Fomes annosus*. **Arch. Microbiol.**, **125** : 233-237.
- HAARS, A. ; HÜTTERMANN, A. ; 1983 - Laccase induction in the white-rot fungus *Heterobasidion annosum* (Fr.) Bref. (*Fomes annosus* Fr. Cooke). **Arch. Microbiol.**, **134** : 309-313.
- HAARS, A. ; CHET, I. ; HÜTTERMANN, A. ; 1981 - Effect of phenolic compounds and tannin on growth and laccase activity of *Fomes annosus*. **Eur. J. For. Path.**, **111** : 67-76.
- HAARS, A. ; CWIELONG, P. ; HÜTTERMANN, A. ; 1984 - Effect of phenolic and other aromatic substances on growth, morphology and certain enzymatic activities of *Fomes annosus*. In : **Proceed. 6 th Int. Conf. Root and Butt Rots of Forest Trees**, KILE, G.A. Ed., CSIRO, Melbourne : 207-220.
- HALL, P.L. ; 1980 - Enzymatic transformations of lignin : 2. **Enzyme Microb. Technol.**, **2** : 170-176.
- HAMMERSCHMIDT, R. ; KUC, J. ; 1982 - Lignification as a mechanism for induced systemic resistance in cucumber. **Physiol. Plant Pathol.**, **20** : 61-71.
- HARKIN, J.M. ; OBST, J.R. ; 1973 - Syringaldazine, an effective reagent for detecting laccase and peroxydase in fungi. **Experimentia**, **29** : 381-387.
- HARKIN, J.M. ; LARSEN, M.J. ; OBST, J.R. ; 1974 - Use of syringaldazine for detection of laccase in sporophores of wood rotting fungi. **Mycologia**, **LXVI** : 469-476.
- HARTLEY, R.D. ; 1972 - Improved methods for the estimation by gas-liquid chromatography of lignin degradation products from plants. **J. Chromtog.**, **54** : 335-344.
- HARVEY, P.J. ; SCHOEMAKER, H.E. ; BOWEN, R.M. ; PALMER, J.M. ; 1985 - Single electron transfer processes and the reaction mechanism of enzymic degradation of lignin. **FEBS Letters**, **183** (1), 13-16.
- HIGHLEY, T.L. ; KIRK, T.K. ; 1979 - Mechanisms of wood decay and the unique features in hearts rots. **Phytopathology**, **69** : 1151-1157.

- HENDERSON, S.J. ; FRIEND, J. ; 1979 - Increase in PAL and lignin-like compounds as race-specific resistance responses of potato tubers to *Phytophthora infestans*. **Phytopathol. Z.** **94** : 323-334.
- HIGHLEY, T.L. ; 1977 - Degradation of cellulose by culture filtrates, of *Poria placenta*. **Mater. Org.** , **12 (3)** : 161-174.
- HIGHLEY, T.L. ; 1980 - Degradation of cellulose by *Poria placenta* in the presence of compounds that affect Hydrogen peroxide. **Mater. Org.** , **15 (2)**: 81-90.
- HIGHLEY, T.L. ; 1982 - Is extracellular hydrogen peroxide involved in cellulose degradation by brown-rot fungi? **Mater. Org.** , **17 (3)** : 205-214.
- HIGHLEY, T.L. ; WOLTER, K.E. ; EYANS, F.J., 1981 - Polysaccharide-degrading complex produced in wood and in liquid media by the brown-rot fungus *Poria placenta*, **Wood Fiber**, **13 (4)** : 265-274.
- HIJWEGEN, T. ; 1963 - Lignification, a possible mechanism of active resistance against pathogens. **Neth. J. Plant Pathol.** , **69** : 314-317.
- HILTON, R.M., 1959 : *Maladies of Hevea in Malaya*. Ed. by **The Rubber Research Institute** Kuala Lumpur, Malaya, pp. 101.
- HISLOP, E.C. ; STAHMANN, M.A. ; 1971 - Peroxidase and ethylene production by barley leaves infected with *Erysiphe graminis* sp. *hordei*. **Physiol. Plant Pathol.** , **1** : 297-312.
- HODGES, C.S. ; TENORIO, J.A. ; 1984 - Root diseases of *Delonix regia* and associated tree species in the Mariana Islands caused by *Phellinus noxius*. **Plant Disease**, **68 (4)** : 334-336.
- HUBBES, M. ; MCGAULEY, B. ; 1976 - Factor contributing to the resistance of *Pinus densiflora* (Sieb. and Zucc.) and susceptibility of *Pinus rigida* x *radiata* to *Fomes annosus*. **Eur. J. For. Path.** , **6** : 176-184.
- HÜTTERMANN, A. ; 1977 - Gelchromatographie von Na-Ligninsulfonaten an Sepharose CL 6B. **Holzforschung**, **31** : 45-50.
- HÜTTERMANN, A. ; GEBAUER, Mm. ; VOLGER, C. ; RÖSGER, C. ; 1977 - Polymerisation und Abbau von Natrium-Lignosulfonat durch *Fomes annosus* (Fr.) Cooke. **Holzforschung**, **31** : 83-89.
- HÜTTERMANN, A. ; TRJANOWSKI, J. ; HAARS, A. ; BÜTTCHER, U. ; 1983 - Physiology and mechanisms of lignin degradation by *Heterobasidion annosum*. **Proceed. 6th Int. Conf. on root and buttrots in forest Trees**. I.U.F.R.O., Melbourne, pp. 257-268.
- HÜTTERMANN, A. ; VOLGER, Ch. ; SCHORN, R. ; ANNERT, O. ; GANSER, H.O. ; 1979 - Studies on isoenzyme polymorphism in *Fomes annosus*. **Eur. J. For. Path.** , **9** : 265-274.
- ISHIHARA, T. ; 1980 - The role of laccase in lignin biodegradation. In : **Lignin Biodegradation : microbiology, chemistry and potential applications**. vol. II. KIRK, T.K. ; HIGUCHI, T. ; CHANG, H.-M., Eds CRC Press, Boca Raton, Florida: pp. 17-31.
- ISHIHARA, T. ; MIYAZAKI, M. ; 1972 - Oxidation of milled wood lignin by fungal laccase. **Mokuzai Gakkaishi**, **18** : 415-419.
- IWAHARA, S. ; HIROSE, T. ; 1983 - The role of laccase in the degradation of dioxane-water hydrolysis lignins. **Tech. Bul. Faculty of Agric. Kagwa University**, **31 (1)** : 13-18.
- JENG, R.S. ; ALFENAS, A.C. ; HUBBES, M. ; DUMAS, M. ; 1983 - Presence and accumulation of fungitoxic substances against *Ceratocystis ulmi* in *Ulmus americana*: possible relation to induced resistance. **Eur. J. For. Pathol.** , **13** : 239-244.
- JOHANSSON, M. ; POPOFF, T. ; THEANDER, O. ; 1976 - Effects of spruce root constituents on extracellular enzymes of *Fomes annosus*. **Physiol. Plant.** , **37** : 275-282.
- JOHANSSON, M. ; THEANDER, T. ; 1974 - Changes in sapwood of roots of Norway spruce, attacked by *Fomes annosus*. Part I. **Physiol. Plant.** , **30** : 218-225.
- JOHANSSON, M. ; UNESTAM, T. ; 1982 - The search for resistance to *Heterobasidion* root rot in Norway spruce: old and new approaches in studies of infection biology. **Eur. J. For. Path.** , **12 (6-7)** : 346-357
- JOHNSON, L.B. ; CUNNINGHAM, B. A. ; 1972 : Peroxidase activity in healthy and leafrust-infected wheat leaves. **Phytochemistry** , **11** : 547-551.
- JOEL, D.M. ; MARBACH, I. ; MAYER, A .M. ; 1978 - Laccase in *Anarcadiaceae*. **Phytochemistry** ,

- 17: 796-797.
- KAPLAN, D.L. ; 1979 - Reactivity of different oxidases with lignins and lignin model compounds. **Phytochemistry**, **18** : 1917-1919.
- KAPLAN, D.L. ; HARTENSTEIN, R. ; 1980 - Decomposition of lignins by microorganisms. **Soil Biol. Biochem.**, **12** : 65-75.
- KERN, H.W. ; 1983 - Action of the white-rot fungus *Sporotrichum pulverulentum* on lignosulfonates. **Holzforschung**, **37** : 287-292.
- KIMMINS, W.C. ; WUDDAH, D. ; 1977 - Hypersensitive resistance : determination of lignin in leaves with localized virus infection. **Phytopathology**, **67** : 1012-1016.
- KIRK, T.K. ; 1971 - Effects of microorganisms on lignin. **Ann. Rev. Phytopathology**, **9** : 185-210.
- KIRK, T.K. ; KELMAN, A. ; 1965 - Lignin degradation as related to the phenoloxidases of selected wood-decaying basidiomycetes. **Phytopathology**, **55** : 739-745.
- KIRK, T.K. ; HARKIN, J.M. ; COWLING, E.B. ; 1968a - Oxidation of guaiacyl- and veratryl-glycerol- β -guaiacyl ether by *Polyporus versicolor* and *Stereum frustulatum*. **Biochim. Biophys. Acta**, **165** : 134-144.
- KIRK, T.K. ; HARKIN, J.M. ; COWLING, E.B. ; 1968b - Degradation of the lignin model compound syringylglycol- β -guaiacyl ether by *Polyporus versicolor* and *Stereum frustulatum*. **Biochim. Biophys. Acta**, **165** : 145-163.
- KIRK, T.K. ; CONNORS, W.T. ; ZEIKUS, J.G. ; 1976 - Requirement of a growth substrate during lignin decomposition by two wood-rotting fungi. **Appl. Environ. Microbiol.**, **32** (1), 192 - 194.
- KIRK, T.K. ; CONNORS, W.J. ; ZEIKUS, J.G. ; 1977 - Advances in understanding the microbiological degradation of lignin. In: **Recent Advances in Phytochemistry. Vol. 2. The structure, biosynthesis and degradation of wood.** LOEWUS, F.A. ; RUNECKLES, V.C. Eds. Plenum Press, New York : pp. 369-394.
- KOENIGS, J.W. ; 1972 - Production of extracellular hydrogen peroxide and peroxidase by wood-rotting fungi. **Phytopathology**, **62** : 100-110.
- KOENIGS, J.W. ; 1974 - Hydrogen peroxide and iron : a proposed system for decomposition of wood by brown-rot basidiomycetes. **Wood and Fiber**, **6** : 66-79.
- KOLATTUKUDY, P.E. ; 1980 - Biopolymer membranes of plants : cutin and suberin. **Science**, **208** : 990-1000.
- KOLATTUKUDY, P.E. ; 1981 - Structure, biosynthesis and biodegradation of cutin and suberin. **Ann. Rev. Plant Physiol.**, **32** : 539-567.
- KUMARI, H.L. ; SIRSI, M. ; 1972 - Purification and properties of laccase from *Ganoderma lucidum*. **Arch. Mikrobiol.**, **84** : 350-357.
- LAI, Y.Z. ; SARKANEN, K.V. ; 1971 - Isolation and structural studies. In : **Lignin-occurrence, formation, structure and reactions.** SARKANEN, K.V. ; LUDWIG, C.H. eds. Wiley-interscience New York, p. 165.
- LAYNE, E. ; 1963 - Spectrophotometric and turbidimetric methods for measuring proteins. In **Methods in Enzymology**, COLOWICK, S.P., KAPLAN, N.O., Ed. Academic press New York, vol. 3 : 447-454.
- LEGRAND, M. ; FRITIG, B. ; HIRTH, L. ; 1976 - Enzymes of the phenylpropanoid pathway and the necrotic reaction of hypersensitive tobacco to tobacco mosaic virus. **Phytochemistry**, **15** (9) : 1353-1360.
- LEONOWICZ, A. ; TROJANOWSKI, J. ; 1975a - Induction of laccase by ferrulic acid in Basidiomycetes. **Acta Biochem. Polon.**, **22** (4) : 291-295.
- LEONOWICZ, A. ; TROJANOWSKI, J. ; 1975b - Induction of laccase form in the fungus *Pleurotus ostreatus* by ferrulic acid. **Microbios**, **13** : 167-174.
- LEONOWICZ, A. ; SZKLARZ, G. ; WOJTAS-WASILEWSKA, M. ; 1985 - The effect of fungal laccase on fractionated lignosulfonates (Peritan Na). **Phytochemistry**, **24** (3) : 393-396.
- LEVINE, W.G. ; 1966 - Laccase, a review. In **Biochemistry of copper.** PEISACH, J. ; AISEN, P. ; BLUMBERG, W.E. Ed. Academic Press, New York, pp. 371-384.
- LOBARZEWSKI, J. ; 1984 - A comparison of the effects of immobilized fungal mycelium fragments of *Trametes versicolor* and fungal peroxydase on Peritan-Na (Na lignosulfonates). **Holzforschung**, **38**, (2) : 105-108.

- LOBARZEWSKI, J. ; TROJANOWSKI, J. ; WOJTAS-WASILEWSKA, M. ; 1982 - The effects of fungal peroxidase on Na-lignosulfonates. **Holzforschung**, **36 (4)** : 173-176.
- Mac MILLAN, J.E. ; VAUGHN, R.H. ; 1964 - Purification and properties of a polygalacturonic acid transeliminase from *Clostridium multifementans*. **Biochemistry**, **3**, 564-572.
- MADKOUR, M.A. ; ALY, M.N., 1981 : Cell Wall degrading enzymes produced during pathogenesis of *Macrophomina phaseolina* on strawberry plants. **Phytopath. Z.**, **100** : 36-43.
- MALKIN, R. ; MALMSTRÖM, B.G. ; VÄNNGÅRD, T. ; 1969a - The reversible removal of one specific copper (II) from fungal laccase. **European J. Biochem.**, **7** : 253-259.
- MALKIN, R. ; MALMSTRÖM, B.G. ; VÄNNGÅRD, T. ; 1969b - Spectroscopic differentiation of the electron-accepting sites in fungal laccase. Association of a near ultraviolet band with two electron-accepting unit. **Eur. J. Biochem.**, **10** : 324-329.
- MARTIN, R. ; 1964 - Sur la propension de *Fomes lignosus*, agent de la pourriture blanche des racines d'Hévéa, à la fonction rhizomorphe hors du milieu souterrain. Etude d'une méthode de détection. **Revue Gén. Caoutch. Plastiq.**, **41 (2)** : 279.
- MARTIN, R. ; Du PLESSIX, C.J. ; 1965 - Notes sur la pourriture blanche des racines d'Hévéa (*Leptoporus lignosus*) en Basse Côte d'Ivoire. **Revue Gén. Caoutch. Plastiq.**, **42 (10)** : 1323.
- MASSALA, R. ; 1981 - Utilisation d'inhibiteurs compétitifs de la phénylalanine ammonia-lyase (PAL) en pathologie végétale : application à l'étude du rôle des phénylpropanoïdes dans la résistance hypersensible aux virus. **Thèse de Doctorat d'Etat**. Strasbourg.
- MAULE, A.J. ; RIDE, J.P. ; 1976 - Ammonia-lyase and o-methyl transferase activities related to lignification in wheat leaves infected with *Botrytis*. **Phytochemistry**, **15** : 1661-1664.
- MAYER, A.M. ; HAREL, E. ; 1979 - Polyphenol oxidases in plants. **Phytochemistry**, **18** : 193-215.
- MAZAU, D. ; ESQUERRE-TUGAYE, M.T. ; 1976 - Hydroxyproline et peroxydase dans les parois cellulaires et le cytoplasme de tiges de melons atteints d'Anthracnose. **Plant Sc. Let.**, **7** : 119-125.
- MINUTH, W. ; KLISCHIES, M. ; ESSER, K. ; 1978 - The phenoloxidases of the Ascomycete *Podospore anserina*. Structural differences between laccases of high and low molecular weight. **Eur. J. Biochem.**, **90** : 73-82.
- MOLITORIS, P. ; ESSER, K. ; 1970 - Die Phenoloxidasen des Ascomyceten *Podospore anserina* V. Eigenschaften der Laccase 1 nach weiterer Reinigung. **Arch. Mikrobiol.**, **72** : 267-296..
- MONTIES, B. ; 1980 - Les lignines. In : **Les Polymères végétaux ; polymères pariétaux et alimentaires non azotés**. MONTIES, B., Ed. ; GAUTHIER-VILLARS, Paris, 148-155.
- MONTIES, B. ; LAPIERRE, C. ; 1981 - Hétérogénéité des lignines. **Physiol. Vég.**, **19** : 327-348.
- MOSBACH, R. ; 1963 - Purification and some properties of laccase from *Polyporus versicolor*. **Biochim. Biophys. Acta.**, **73** : 204-212.
- MURRAY, R.K.S. ; 1930 - Diseases of rubber in Ceylan. Issued by The Rubber Research Scheme (Ceylan), pp. 38.
- NANDRS, D. ; 1985 - Pathogénèse et épidémiologie des pourridies de l'*Hevea brasiliensis*. **Thèse de Doctorat de l'Université Pierre et Marie Curie - PARIS VI**.
- NANDRIS, D. ; NICOLE, M. ; GEIGER, J.P. ; 1983 - Infections artificielles de jeunes plants d'*Hevea brasiliensis* par *Rigidoporus lignosus* (Kl.) Imaz. et *Phellinus noxius* (Corner). G.H.H. Cunn. **Eur. J. For. Path.**, **13** : 65-76.
- NANDRIS, D. ; TRAN VAN CANH ; GEIGER, J.P. ; OMONT, H. ; NICOLE, M. ; 1984 - Remote sensing in plant diseases using infrared color aerial photography. Application trials in Ivory Coast to root diseases of *Hevea brasiliensis*. **Eur. J. For. Path.**, **15 (1)** : 11 - 21.
- NANDRIS, D. ; NICOLE, M. ; GEIGER, J.P. ; RIO, B. ; 1984 - Pathogénie et variabilité des populations africaines de *Rigidoporus lignosus* et *Phellinus noxius*. **Proceed. XXVII Col. Soc. Fr. Phytopathologie**, Paris.
- NICOLE, M. ; 1984 - Approches biologique et ultrastructurale des modalités du parasitisme de *Rigidoporus lignosus* et *Phellinus noxius* sur *Hevea brasiliensis*. **Thèse Doctorat 3^e cycle**. Université P. SABATIER, Toulouse.
- NICOLE, M. ; GEIGER, J.P. ; NANDRIS, D. ; 1982 - Interactions hôte-parasite entre *Hevea brasiliensis* et les agents de pourriture racinaire *Phellinus noxius* et *Rigidoporus lignosus* : Etude phytopathologique comparée. **Phytopath.Z.**, **105** : 311-326.

- NICOLE, M. ; NANDRIS, D. ; GEIGER, J.P. ; 1983 - Cinétique de l'infection de plants d'*Hevea brasiliensis* (Wild. ex. ADR. de Juss) Mull. Arg. par *Rigidoporus lignosus* (Kl.) Imazeki. **Can. J. For. Res.**, **13** : 359-364.
- NICOLE, M. ; GEIGER, J.P. ; NANDRIS, D. ; 1985 - Root rot disease of *Hevea brasiliensis*. II. Some host reactions (accepted for publication in **Eur. J. For. Pathol.**).
- OHGUCHI, T. ; ASADA, Y. ; 1975 - Dehydrogenation polymerization products of p-hydroxycinnamyl alcohols by isoperoxidases obtained from downy mildew infected root of Japanese radish (*Raphanus sativus*). **Physiol. Plant Pathol.**, **5** : 183-192.
- OHGUCHI, T. ; YAMASCHITA, Y. ; ASADA, Y. ; 1974 - Isoperoxidase of Japanese radish root infected by downy mildew fungus. **Ann. Phytopathol. Soc. Japan.**, **40** (5) : 419-426.
- PEEK, R.D. ; LIESE, W. ; PARAMESWARAN, N. ; 1972a - Infektion und Abbau des Wurzelrinde von Fichte durch *Fomes annosus*. **Eur. J. For. Path.**, **2** : 104-115.
- PEEK, R.D. ; LIESE, W. ; PARAMESWARAN, N. ; 1972b - Infektion und Abbau des Wurzelholzes von Fichte durch *Fomes annosus*. **Eur. J. For. Path.**, **2** : 237-248.
- PEGG, G. F. ; 1977 - Glucanohydrolases of higher plants: a possible defence mechanism against parasitic fungi. In : Cell Wall Biochemistry Related to specificity in host plant pathogen interactions. SOLHEIM, B. ; ROA, J. Eds., Universitetsforlaget, OSLO, pp 304-345.
- PEGG, G.F. ; YOUNG, D.H. ; 1981 - Changes in glycosidase activity and their relationship to fungal colonization during infection of tomato by *Verticillium albo-atrum*. **Physiol. Plant Pathol.**, **19** : 371-382.
- PEGLER, D.N. ; WATERSTON, J.M. ; 1968 - *Phellinus noxius* C.M.I. Descriptions of pathogenic Fungi and Bacteria, n° 195.
- PETCH, T. ; 1928 - Tropical root disease fungi. **Trans. Brit. Myc. Soc.**, **XIII** (3-4) : 238-253.
- PETTERSSON, O. ; EAKER, D.L. ; 1968 - Studies on cellulolytic enzymes. III. Chemical and Physicochemical characterization of a cellulase from *Penicillium notatum*. **Arch. Biochem. Biophys.** **124** : 154-159.
- PICHEL, R.I. ; 1956 - Les pourridiés de l'Hévéa dans la cuvette congolaise. Publications de l'I.N.E.A.C., Série Technique n° 49, pp. 480.
- POPOFF, T. ; THEANDER, O. ; JOHANSSON, M. ; 1975 - Changes in sapwood of roots of Norway spruce attacked by *Fomes annosus*. Part II. Organic chemical constituents and their biological effects. **Physiol. Plant.**, **34** : 347-350.
- PURVIS, M.J. ; COLLIER, D.C. ; WALLS, D. ; 1963 - Some useful tests for Biologically important-substances. In : Laboratory Techniques in Botany. BUTTERWORTHS and Co Publishers, London, pp 152-157.
- QUESSADA, M.P. ; MACHEIX, J.J. ; 1984 - Caractérisation d'une peroxydase impliquée spécifiquement dans la lignification, en relation avec l'incompatibilité au greffage chez l'abricotier. **Physiol. Vég.**, **22** (5) : 533-540.
- RABENANTOANDRO, Y. ; AURIOL, P. ; TOUZE, A. ; 1976 - Implication of β -(1 \rightarrow 3) glucanase in melon anthracnose. **Physiol. Plant Pathol.**, **8** : 313-324.
- REESE, E.T. ; 1963 - Advances in enzymic hydrolysis of cellulose and related materials. REESE, E.T. ed., MACMILLAN (Pergamon Press), New York.
- REESE, E.T. ; SIU, R.G.H. ; LEVINSON, H.S. ; 1950 - The biological degradation of soluble derivatives and its relationship to the mechanism of cellulose hydrolysis. **J. Bact.**, **59** : 485-497.
- REINHAMMAR, B. ; 1970 - Purification and properties of laccase and stellacyanin from *Rhus vernifera*. **Biochem. Biophys. Acta**, **205** : 35-47.
- RETIQ, N. ; 1974 - Changes in peroxidase and polyphenol oxidase associated with natural and induced resistance of tomato to *Fusarium* Wilt. **Physiol. Plant Pathol.**, **4** : 145-150.
- RIDE, J.P. ; 1975 - Lignification in wounded 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** : 302-306.

- RIDE, J.P. ; PEARCE, R.B. ; 1979 - Lignification and papilla formation at sites of attempted penetration of wheat leaves by non pathogenic fungi. **Physiol. Plant Pathol.**, **15** : 79-92.
- ROGER, L. ; 1951 - Pathologie des Pays chauds. Tome I. LECHEVALLIER, P. éd., Paris, pp 1049-1052.
- RÖSCH, R. ; LIESE, W. ; 1971 - Untersuchungen über die Enzyme von Bläuepilzen. II. Phenoloxidasen-Aktivität. **Arch. Mikrobiol.**, **76** : 212-218.
- RUEL, K. ; BARNOUD, F. ; ERIKSSON, K.E. ; 1981 - Micromorphological and ultrastructural aspects of spruce wood degradation by wild-type *Sporotrichum pulverulentum* and its cellulase-less mutant cel 44. **Holzforschung**, **35** : 157-171.
- SACCAS, A.M. ; 1953a - Les principales maladies cryptogamiques de l'Hévéa en A.E.F.. **Agr. Trop.**, **VIII**, **2** : 1176-198.
- SACCAS, A.M. ; 1953b - Les principales maladies cryptogamiques de l'Hévéa en A.E.F. (Fin). **Agr. Trop.**, **VIII**, **3** : 229-285.
- SACCAS, A.M. ; 1975 - Les pourridiés des caféiers en Afrique tropicale. I.F.C.C. (Institut Français du Café et du Cacao), Bul. n° 13, 172 p.
- SADDLER, J.N. ; KHAN, A.W. ; 1980 - Cellulase production by *Acetivibrio cellulolyticus*. **Can. J. Microbiol.**, **26** : 760-765.
- SADDLER, J.N. ; KHAN, A.W. ; MARTIN, S.M. ; 1980 - Regulation of cellulase synthesis in *Acetivibrio cellulolyticus*. **Microbios**, **28** : 97-106.
- SCHANEL, L. ; ESSER, K. ; 1971 - The phenoloxidasen of the Ascomycete *Podospora anserina*. VII. Substrate specificity of laccases with different molecular structures. **Arch. Mikrobiol.** **77** : 111-117.
- SCHANEL, L. ; BLAICH, R. ; ESSER, K. ; 1971 - Function of enzymes in wood destroying fungi. I. Comparative studies of Intracellular and Extracellular enzymes in *Trametes versicolor* and *Trametes hirsuta*. **Arch. Mikrobiol.**, **77** : 140-150.
- SCHOEMAKER, H.E. ; HARVEY, P.J. ; BOWEN, R.M. ; PALMER, J.M. ; 1985 - On the mechanism of enzymatic lignin breakdown. **FEBS Letters**, **183** (1) : 7 - 12.
- SEEVERS, P.M. ; DALY, J.M. ; CATEDRAL, F.F. ; 1971 - The role of peroxidase isoenzymes in resistance to wheat stem rust disease. **Plant Physiol.**, **48** : 353-360.
- SELIN, J.-F. ; SUNDMAN, V. ; 1971 - Microbial action on lignosulfonates. **Finska Kemisto. Medd.**, **80** : 11-19.
- SHAIN, L. ; 1971 - The response of sapwood of Norway spruce to infection by *Fomes annosus*. **Phytopathology**, **61** : 301-307.
- SHAIN, L. ; HILLIS, W.E. ; 1971 - Phenolic extractives in Norway spruce and their effect on *Fomes annosus*. **Phytopathology**, **61** : 841-845.
- SHARPLES, A. ; 1936 - Diseases and pests of the rubber tree. Ed. Mac-Millan and Co., London, pp. 480.
- SHAW, R. ; PRASAD, R. ; 1970 - Starch electrophoresis of enzymes. A. Compilation of recipes. **Biochemical Genetics**, **4** : 297-320.
- SHERWOOD, R.T. ; 1966 - Pectin lyase and polygalacturonase production by *Rhizactonia solani* and other fungi. **Phytopathology**, **56** : 279-286.
- SMITHIES, O. ; 1955 - Zone electrophoresis in starch gels. Group variations in the serum proteins of normal human adults. **Biochem. J.**, **61** : 629-641.
- SUNDMAN, V. ; SELIN, J.-F. ; 1970 - Microbial utilization of lignosulfonates of various molecular sizes. **Papper och Trä**, **8** : 473-479.
- SUNDMAN, V. ; NÄSE, L. ; 1971 - A simple plate test for direct visualization of biological lignin degradation. **Papper och Trä**, **2** : 67-71.
- SYALDI, R. ; ELGERSMA, D.M. ; 1982 - Further studies on the activity of cell wall degrading enzymes of aggressive and non aggressive isolates of *Ophiostoma ulmi*. **Eur. J. For. Path.**, **12** : 29-36.
- THOROLD, C.A. ; 1975 - Root diseases. In: Diseases of cocoa. Oxford University Press. pp 146-157.
- TIEN, M. ; KIRK, T.K. ; 1983 - Lignin degrading enzyme from the Hymenomycete *Phanerochete chrysosporium*. **Burds. Science**, **221** : 661-663.
- TIEN, M. ; KIRK, T.K. ; 1984 - Lignin-degrading enzyme from the Hymenomycete *Phanerochete chrysosporium* : purification, characterization, and catalytic properties of a unique

- H₂O₂-requiring oxygenase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **81** : 2280-2284.
- TOUZE, A. ; 1972 - La dégradation enzymatique des parois cellulaires des végétaux par les parasites fongiques. *Ann. Phytopathologie*, **4** : 285-293.
- TOUZE, A. ; 1977 - Quelques événements accompagnant l'installation d'un parasite fongique chez un hôte végétal. In : Travaux dédiés à G. VIENNOT-BOURGIN, Soc. Fr. Phytopathologie Ed., pp 375-385.
- TOUZE, A. ; ESQUERRE-TUGAYE, M.T. ; 1982 - Defence mechanisms of plants against varietal non-specific pathogens. In : Active Defence Mechanisms in Plants. WOOD R.K.S., Ed., NATO Advanced Study Institutes Series. Serie A: Life Science, pp 103-117.
- TOUZE, A. ; ROSSIGNOL, M. ; 1977 - Lignification and the onset of premunition in musk melon plants. In : Cell Wall Biochemistry related to specificity in Host-Plant Pathogen Interactions. SOLHEIM, B. ; RAA, J., Ed. Universitetsforlaget, Oslo, pp. 269-293.
- UMEZAWA, T. ; NAKATSUBO, F. ; HIGUCHI, T. ; 1982 - Lignin degradation by *Phanerachete chrysosporium* : metabolism of a phenolic phenylcoumaran substructure model compound. *Arch. Microbiol.*, **131** : 124-128.
- YAN VLIET, W.F. ; 1954 - The enzymic oxidation of lignin. *Biochim. Biophys. Acta*, **15** : 211-216.
- YANCE, C.P. ; SHERWOOD, R.T. ; 1976a - Cycloheximide treatments implicate papilla formation in resistance of reed canary-grass to fungi. *Phytopathology*, **66** : 498-502.
- YANCE, C.P. ; SHERWOOD, R.T. ; 1976b - Regulation of lignin formation in reed canary-grass in relation to disease resistance. *Plant Physiol.*, **57** : 915-919.
- YANCE, C.P. ; SHERWOOD, R.T. ; 1977 - Lignified papillae formation as a mechanism for protection in reed canary-grass. *Physiol. Plant Pathol.* **10** : 247-256.
- YANCE, C.P. ; ANDERSON, J.O. ; SHERWOOD, R.T. ; 1976 - Soluble and cell wall peroxidases in reed canary-grass in relation to disease resistance and localized lignin formation. *Plant Physiol.*, **57** : 920-922.
- YANCE, C.P. ; KIRK, T.K. ; SHERWOOD, R.T. ; 1980 - Lignification as a mechanism of disease resistance. *Ann. Rev. Phytopathol.*, **18** : 259-288.
- VEGETTI, G. ; CONTI, G.G. ; PESCI, P. ; 1975 - Changes in phenylalanine ammonia-lyase, peroxidase and polyphenoloxidase during development of local necrotic lesions in Pinto bean leaves infected with Alfalfa Mosaic Virus. *Phytopath. Z.*, **84** : 153-171.
- WARGO, P.M. ; 1975 - Lysis of the cell wall of *Amillaria mellea* by enzymes from forest trees. *Physiol. Plant Pathol.*, **5** : 99-105.
- WEBER, K. ; OSBORN, M. ; 1969 - The reliability of molecular weight determination by dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis. *J. Biol. Chem.*, **244** : 4406-4412.
- WESTERMARK, U. ; ERIKSSON, K.E. ; 1974a - Carbohydrate-dependent enzymic quinone reduction during lignin degradation. *Acta Chem. Scand.*, **28** : 204-208.
- WESTERMARK, U. ; ERIKSSON, K.E. ; 1974b - Cellobiose : quinone oxydoreductase, a new wood-degrading enzyme from white-rot fungi. *Acta Chem. Scand.*, **28** : 209-214.
- WESTERMARK, U. ; ERIKSSON, K.E. ; 1975 - Purification and properties of cellobiose-quinone oxidoreductase from *Sporotrichum pulverulentum*. *Acta Chem. Scand.*, **29**, (4) : 419-424.
- WORRAL, J.J. ; PARMETER, J.R. ; 1982 - Wetwood formation as a host response in white fir. *Eur. J. For. Path.*, **12** : 432-441.
- WOOD, T.M. ; McCRAE, S.I. ; 1972 - The purification and properties of the C1 component of *Trichoderma konigii* cellulase. *Biochem. J.*, **128** : 1183-1192.
- WOOD, T.M. ; McCRAE, S.I. ; 1978 - The mechanism of cellulase action with particular reference to the C1 component. In Bioconversion of cellulosic substances into energy, chemicals and microbial protein. GHOSE, T.K., ed., I.I.T., New Dehli, pp 111-142.
- WOODS, A.C. ; HOLMES, F.W. ; 1974 - Extraction of fluid from healthy and Dutch elm diseased elm branches using hydraulic compression. *Phytopathology*, **64** : 1265-1267.
- YOUNG, D.H. ; PEGG, G.F. ; 1981 - Purification and characterization of 1,3-β-glucan hydrolases from healthy and *Verticillium albo-atrum* infected tomato plants. *Physiol. Plant Pathol.*, **19** : 391-417.
- ZUBER, M. ; MANIBHUSHANDRAO, K. ; 1982 - Studies on comparative gel electrophoretic patterns of proteins and enzymes from isolates of *Rhizoctonia solani* causing sheath blight disease in rice. *Can. J. Microbiol.*, **28** (7) : 762-771.

Résumé

Rigidoporus lignosus et *Phellinus noxius* sont deux champignons parasites des racines de l'Hévéa. Lors de l'attaque parasitaire ils provoquent dans les tissus de l'hôte des modifications considérables de plusieurs activités enzymatiques, en particulier de celles d'hydrolases (osidases et polyosidases) et de laccases. Ces activités enzymatiques, contenues dans les tissus parasités, correspondent à celles excrétées par les champignons en culture pure. *In vitro*, elles sont capables de dégrader différents polymères végétaux, en particulier le complexe lignocellulosique préparé à partir de sciure de bois d'Hévéa. La laccase exerce une double action sur la lignine conduisant soit à la scission, soit à la condensation du polymère. Il existe un équilibre entre ces deux réactions.

In vivo et *in vitro*, la proportion entre glycosidases et laccase est une caractéristique de chaque champignon; il existe une prédominance des premières chez *P. noxius*, des secondes chez *R. lignosus*. Cette "balance" influe sur leur comportement tant saprophytique que parasitaire. Ainsi, *in vitro*, *P. noxius* tend à dégrader plus rapidement la fraction polyosidique que la fraction lignine, alors que *R. lignosus* tend à dépolymériser prioritairement la lignine. *In vivo* ces différences de comportement sont encore plus marquées puisque, sur de jeunes plantules infectées artificiellement, *P. noxius* attaque en priorité les tissus de type cellulosique du phloème, tandis que *R. lignosus* s'installe très rapidement dans les tissus lignifiés du xylème. Il existe donc une corrélation étroite entre les potentialités des agents pathogènes en matière d'excrétion d'enzymes et leur comportement parasitaire, au moins en ce qui concerne la phase d'envahissement des tissus.

L'Hévéa réagit à l'agression parasitaire par une stimulation de l'activité peroxydasique, exceptionnelle de par son amplitude (facteur de stimulation égal à 4, en moyenne) et sa spécificité: une seule isoperoxydase est, principalement concernée (facteur de stimulation égal à 170 dans certains cas). L'accroissement de l'activité peroxydasique résulte d'une néosynthèse de la protéine enzymatique. Cette enzyme qui polymérise l'alcool coniférylique est susceptible de participer à la lignification réactionnelle mise en évidence dans certains types de tissus.