

**Aspects physiologiques et biochimiques
de la spécialisation parasitaire.**
**Cas particulier des *Corticium rolfsii* (Sacc.) curzi
et *Leptoporus lignosus* (Kl.) Heim ex Pat. Étude *in vitro***

JEAN-PAUL GEIGER

*Laboratoire de Phytopathologie de l'O.R.S.T.O.M.,
Centre d'Adiopodoumé, B.P. 20, ABIDJAN - Côte d'Ivoire*

et

*Laboratoire de Morphologie Expérimentale Végétale, associé au C.N.R.S.,
Faculté des Sciences, 91405 Orsay*

(Manuscrit reçu le 23 janvier 1975)

RÉSUMÉ

Une étude a été menée sur les enzymes excrétées *in vitro* par deux parasites fongiques : le *Corticium rolfsii* et le *Leptoporus lignosus*. Elle a permis de mettre en évidence une corrélation étroite entre la nature des enzymes extracellulaires synthétisées par l'un et l'autre champignon et leur comportement parasitaire respectif. En effet, le *C. rolfsii*, parasite de plantes herbacées, excrète abondamment des hydrolases particulièrement actives pour les faibles valeurs du pH. Ces enzymes sont capables de dégrader la plupart des structures tissulaires et cellulaires de l'hôte que le parasite est susceptible d'acidifier lui-même en excréant de l'acide oxalique. En revanche, le *L. lignosus*, parasite d'organes lignifiés, libère essentiellement des laccases responsables de la dépolymérisation de la lignine.

Le thalle des deux agents pathogènes est constitué de plusieurs types d'hyphes, les unes intramatricielles, les autres superficielles. Ces formes mycéliennes diffèrent entre elles non seulement par leurs caractères morphologiques et leurs aptitudes respiratoires, mais également par leurs capacités d'excrétion enzymatique. Seuls les filaments intramatriciels sont aptes à libérer activement les enzymes étudiées.

Enfin, selon des critères purement biochimiques, les éléments homologues du thalle des deux champignons remplissent, sur le plan des processus parasitaires, des fonctions identiques, le pouvoir pathogène étant détenu par les hyphes intramatricielles.

SUMMARY

A study of extracellular enzymes produced in vitro by two fungal parasites, Corticium rolfsii and Leptoporus lignosus, has put forward a close correlation between the nature of enzymes excreted by each of these fungi and their parasitic specialization. C. rolfsii, which parasitizes herbaceous plants produces abundant hydrolases especially active at low pH conditions. These enzymes are able to damage most of the cellular and

tissular structures of the host conveniently acidified by the oxalic acid production of the parasite itself. On the contrary, *L. lignosus* develops mostly in lignified tissues and secretes laccases responsible for lignine depolymerization.

The thallus of both parasites is composed by two mycelial types, an intramatricial one which penetrates deeply through the culture medium and another one which remains at the surface. These hyphal forms present differences not only in their morphological and respiratory characteristics but also in their abilities of producing extracellular enzymes. The first type only is able to release those enzymes.

Lastly, according to purely biochemical criteria, the homologous elements of the thallus of these fungi assume identical functions, as for parasitic processes, the intramatricial type possessing pathogenicity.

INTRODUCTION

Les recherches effectuées par BOISSON (1968 *a* et *b*) sur le *Leptoporus lignosus* et GOUJON (1966, 1967) sur le *Corticium rolfsii* ont montré que ces champignons présentent de nombreuses analogies au niveau de leur cycle de développement, de la morphologie et des aptitudes respiratoires des différents types mycéliens constitutifs de leur thalle. En effet, dans l'un et l'autre cas le thalle comporte d'une part des filaments intramatriciels, de diamètre réduit et dont la vitesse d'allongement est faible, capables, *in vitro*, d'exploiter le substrat en profondeur et de végéter en anoxie partielle. D'autre part, il possède des hyphes de diamètre plus important et dont la croissance uniquement superficielle est plus rapide. Aussi ces auteurs (BOISSON et GOUJON, 1969) considèrent-ils les filaments de type A (intramatriciels) et de type B (superficiels) du *L. lignosus* comme respectivement homologues des hyphes latérales et conductrices du *C. rolfsii*.

Ces deux agents pathogènes sont fréquents dans les sols des régions intertropicales humides et tous les deux sont susceptibles d'envahir le collet ou les organes souterrains de très nombreux végétaux cultivés ou spontanés. Bien que polyphages, ils s'attaquent préférentiellement à des organes de structure et de composition différentes. Le *L. lignosus* est un parasite d'organes fortement lignifiés tels que les racines de nombreuses plantes arbustives en revanche, le *C. rolfsii* ne pénètre que des organes peu lignifiés.

ABRÉVIATIONS

DO	: densité optique;
DOPA	: d, 1-dihydroxyphénylalanine;
β -N-ac	: β -N-acétylglucosaminidase;
β -gal	: β -galactosidase;
α -glu	: α -glucosidase;
β -glu	: β -glucosidase;
EDTA	: Éthylène diamine tétracétique (acide);
Glyoxylate DH	: Glyoxylate déshydrogénase;
Pase	: phosphatase;
Dipase	: Phosphodiesterase;
RNA	: acide ribonucléique;
RNase	: ribonucléase.

Des observations cytologiques ont mis en évidence que, dans le cas d'infections dues à ce dernier parasite, seules, les hyphes intramatricielles progressent au sein des tissus de l'hôte (GOUJON, 1969).

Ces données soulèvent deux questions principales relatives, l'une à la différence de comportement parasitaire des deux organismes, l'autre, à la spécialisation parasitaire de chaque type mycélien.

Les parasites fongiques sont réputés exploiter les tissus de leurs hôtes grâce à des enzymes extracellulaires (inter alia : BATEMAN et MILLAR, 1966). Aussi avons-nous tenté d'apporter une réponse à ces questions d'une part en effectuant un inventaire des enzymes libérées par les deux champignons, d'autre part, en évaluant les capacités d'excrétion enzymatique de chaque forme mycélienne.

De nombreux travaux ayant été réalisés sur certaines polyosides hydrolases nous nous sommes attachés à rechercher non seulement ces enzymes mais également d'autres moins classiquement étudiées (osidases, phosphomono et diestérase...). Nous avons en effet retenu comme hypothèse de travail que toute enzyme excrétée par un agent pathogène peut intervenir dans le déroulement du processus parasitaire.

MATÉRIEL ET TECHNIQUES

I. — PARASITES.

La présente étude porte sur deux Basidiomycètes phytopathogènes : le *Corticium rolfsii* (Sacc.) Curzi, souche 3410 et le *Leptoporus lignosus* (K1.) Heim ex Pat., souche H₄ (mycothèque du Laboratoire de Phytopathologie du Centre de recherches de l'O.R.S.T.O.M., Abidjan, Côte-d'Ivoire).

II. — MILIEUX DE CULTURE.

Milieu haricot.

Ce milieu est préparé en autoclavant 400 g de filets de haricot dans 1 litre d'eau. Le bouillon est filtré sur coton, réajusté à 1 litre, réparti suivant les besoins et stérilisé (20 min à 120°C).

Milieu hévéa.

La préparation est identique à celle du précédent milieu, les filets de haricot étant remplacés par 350 g de sciure de bois d'hévéa.

Milieu sciure d'hévéa.

15 g de sciure de bois d'hévéa sont stérilisés dans un erlenmeyer de 250 ml contenant 100 ml d'eau.

III. — TECHNIQUES DE CULTURE.

1. Thalle entier.

Le bouillon de culture est réparti dans des erlenmeyers de 250 ml à raison de 30 ml par récipient. Le milieu est ensemencé à l'aide d'une bouture circulaire de 0,5 cm de diamètre prélevée à partir d'une préculture sur milieu gélosé. Les cultures, non agitées, se développent à 30 °C sous éclairage continu. Elles sont récoltées à l'âge de 4 jours.

2. Production séparée des différents types mycéliens.

Hyphes intramatriciellles. Qu'il s'agisse du *C. rolfssii* ou du *L. lignosus*, les hyphes intramatricielles sont produites en culture agitée. Dans ces conditions, le thalle, constamment immergé, n'est constitué que par ce type de filaments. Les analyses enzymatiques sont faites sur des cultures âgées de 4 jours pour le *C. rolfssii* et de 7 jours pour le *L. lignosus*.

Mycélium conducteur (C. rolfssii). Au centre d'une boîte de Petri ($\varnothing = 16$ cm) dont le fond est recouvert d'une mince pellicule d'eau, on dispose une coupelle contenant une culture du parasite sur milieu gélosé. Après 5 jours de culture le couvercle de la boîte est envahi par des mèches conductrices. La contamination par des hyphes latérales est négligeable.

Filaments de type B (L. lignosus). Ils sont produits en boîte de Petri contenant du sable imprégné de milieu nutritif sur lequel on a déposé une feuille de cellophane. Celle-ci a pour rôle de favoriser la croissance des filaments B et de retarder le développement des hyphes de type A en les empêchant de se répandre au sein du milieu de culture. Les expériences sont menées sur des cultures âgées de 6 jours.

Structures agrégées (L. lignosus). Elles sont cultivées suivant la technique de BOISSON (1973). Des buchettes d'hévéa envahies par le parasite sont déposées dans une boîte de Roux contenant du sable imbibé d'eau. Après 10 jours de culture les mèches rhizomorphiques ont colonisé la plus grande partie de la surface du sable.

A l'exception des filaments agrégés toutes les formes mycéliennes sont cultivées sur milieu haricot. Toutes les expériences, à l'exception de celles qui visent à analyser l'effet de l'âge des cultures, sont effectuées sur des thalles jeunes qui ne sont pas le siège d'une éventuelle lyse mycélienne.

IV. — PRÉPARATION DES FILTRATS DE CULTURE ET DES EXTRAITS MYCÉLIENS.

1. A partir de thalles entiers.

Les milieux de culture sont filtrés sur verre fritté n° 3. Le mycélium est lavé à l'eau distillée. Filtrat et eaux de lavage correspondantes sont rassemblés, homogénéisés et centrifugés à $30\ 000 \times g$ durant 10 min. Les enzymes extracellulaires sont testées dans le surnageant ainsi obtenu, après concentration éventuelle par dialyse contre du polyéthylène glycol (PEG 6000, PROLABO).

Le mycélium est mis en suspension dans un tampon acétate 0,1 M pH 4 (hydrolases) ou phosphate 0,1 M pH 7 (déshydrogénases) et soumis à 10 broyages successifs de 30 s chacun (broyeur à couteaux SORVALL). L'homogénéisation est parachevée à l'aide d'un broyeur à billes de verre BRAUN (3 min, refroidissement par jet de neige carbonique). Le broyat, débarrassé des billes de verre par filtration sur verre fritté, est centrifugé 30 min à $30\ 000 \times g$ (centrifugeuse réfrigérée SORVALL RG2-B). La concentration en protéines solubles et l'activité des enzymes intracellulaires sont évaluées dans le surnageant ainsi obtenu.

2. A partir des différents types mycéliens.

Les enzymes extracellulaires du *C. rolfssii* sont caractérisées d'une part dans le filtrat de culture et l'eau de lavage des hyphes intramatricielles, d'autre part dans l'eau de lavage du mycélium et du couvercle de la boîte de Petri en ce qui concerne les filaments conducteurs.

Celles qui sont libérées par le *L. lignosus* sont identifiées dans le filtrat de culture et l'eau de lavage du mycélium de type A. L'activité de ces mêmes enzymes est mesurée dans le filtrat de culture et la solution de lavage de la cellophane, du sable et des filaments mycéliens de type B. Enfin une analyse identique est effectuée sur l'eau humectant le sable supportant la croissance des structures agrégées.

Dans tous les cas, la solution de lavage est constituée par un tampon citrate de sodium-acide citrique 0,01 M pH 4,6 dont la pression osmotique est augmentée par addition de mannitol (MERCK) à 0,2 M en concentration finale afin de prévenir un éventuel éclatement des cellules.

Eaux de lavage et filtrats de culture sont ajustés à la même molarité que cette solution pour les diverses substances qu'elle contient. Eaux de lavage et filtrats de culture correspondants sont mélangés et homogénéisés et le volume final mesuré. Une partie aliquote est centrifugée (10 min à $30\,000 \times g$) puis concentrée par dialyse contre du polyéthylène glycol 6 000. Le dialysat est recueilli, son volume mesuré et le taux de concentration calculé. Des expériences ont montré que le taux de récupération, après dialyse concentrante contre du polyéthylène glycol 6 000, est égal à 100 % pour toutes les enzymes à l'exception de la β -glucosidase (90 %).

Les différentes formes mycéliennes (à l'exception des structures agrégées) sont broyées dans une solution tamponnée de composition identique à la précédente. Les techniques de broyage et de centrifugation sont celles décrites plus haut pour la préparation des extraits de thalles entiers.

3. Concentration et conservation des enzymes extracellulaires sous forme de poudre acétonique.

Un volume déterminé de filtrat de culture est centrifugé, refroidi à 0 °C puis versé, sous agitation constante, dans de l'acétone à -15 °C dont le volume est calculé de telle sorte que la préparation finale contienne 80 % d'acétone. Au bout de 12 h, le précipité est récupéré par centrifugation, puis lavé à deux reprises à l'acétone à -15 °C et finalement séché par évaporation sous vide. La poudre est conservée à -20 °C. Avant utilisation, elle est mise en solution à raison de 6 g par millilitre de tampon.

V. — ANALYSE ENZYMATIQUE ET EXPRESSION DES RÉSULTATS.

La nature des enzymes étudiées et les caractéristiques des milieux réactionnels sont résumées dans le tableau I. Nous n'apporterons donc ci-après que les précisions complémentaires concernant la réalisation pratique des essais. Les chiffres 1), 2), ... renvoient au tableau I.

1) *Technique de PUJARNISLE (1969)*. Dans les conditions expérimentales utilisées, la réaction enzymatique est linéaire en fonction du temps et de la quantité d'extrait ou de filtrat mise en œuvre. La réaction est arrêtée par addition de 4 ml de tampon glycine 0,15 M pH 10,8 servant en même temps à développer la coloration du *p*-nitrophénol libéré. L'intensité de la coloration est appréciée en mesurant la densité optique (DO) de la solution à 420 nm (photocolorimètre KLETT SUMMERSON, filtre 42). La concentration en *p*-nitrophénol est calculée en se référant à une courbe d'étalonnage. Les « témoins » sont réalisés de la manière suivante : incubation sans substrat, puis addition du tampon glycine, enfin addition du substrat et mesure de la DO.

2) *Méthode de SCHUCHER et HOKIN (1954)*. La réaction est arrêtée par addition de 7 ml de réactif alcoolique. On laisse la précipitation des polynucléotides s'opérer durant 2 h à -20 °C. Après centrifugation (5 min à $7\,500 \times g$) on lit la DO à 260 nm (spectrophotomètre BECKMAN DB) des produits d'hydrolyse solubles dans l'alcool. Les témoins sont obtenus suivant la même méthode qu'en 1).

3) *Technique de LANCE (1963)*. La somme des DO_{420} de deux types de témoin est retranchée de la DO de l'essai; T1 : milieu réactionnel sans extrait enzymatique; T2 : milieu réactionnel sans substrat.

4) *L'activité des enzymes pectiques et cellulolytiques* est estimée par la méthode viscosimétrique (viscosimètre d'OSTWALD). L'« activité relative » (AR) est définie comme suit :

$$AR = \frac{1\,000}{t_{50}}$$

où t_{50} représente le temps, en minute, nécessaire pour observer une réduction de la viscosité du substrat égale à 50 %.

5) Expression des résultats

Les activités enzymatiques sont appréciées à deux concentrations en extrait ou filtrat de culture. Lorsque les filtrats de culture présentent une activité trop forte pour l'une ou l'autre enzyme, le

TABLEAU I

Milieux réactionnels

Enzymes	substrat (M/l ou %) origines des produits (6)	Tampon, t° incubation vol. milieu	Expression des résultats (5)
Phosphatase (1) (EC. 3.1.3.2)	10mM : <i>p</i> -nitrophénylphosphate de sodium (Merck)	acétate 0,1M pH 4 ; 30° C ; 1 ml	nMoles/min/mg (de protéines)
Phosphodiesterase (1) (EC. 3.1.4.1)	10mM : bis-(<i>p</i> -nitrophényl) phosphate de sodium (Sigma)	idem	nMoles/h/mg
α -glucosidase (1) EC.3.2.1.20	10mM : <i>p</i> -nitrophényl- α -D-glucopyranoside (Sigma)	idem	nMoles/h/mg
β -glucosidase (1) EC.3.2.1.21	10mM : <i>p</i> -nitrophényl- β -D-glucopyranoside (Sigma)	idem	nMoles/min/mg
β -galactosidase (1) EC.3.2.1.23	10mM : <i>p</i> -nitrophényl- β -D-galactopyranoside (Sigma)	idem	nMoles/min/mg
β -N-acétylglucosaminidase (1) EC.3.2.1.30	2mM : <i>p</i> -nitrophényl-2-acétamido-2-désoxy- β -D-glucopyranoside (Sigma)	idem	nMoles/min/mg
RNase (2)	0,5 % : RNA de levure polymérisé (Calbiochem)	idem	DO ₂₆₀ x 100/h/mg
Phénoloxydase (3)	0,2 % : DOPA ou gaïacol (Merck)	phosphate 0,1 M pH 6 ; 5 ml ; t° ambiante	DO ₄₂₀ x 1000/min/mg
Pectinase (4)	1 % : polypectate de sodium (Sigma)	citrate 0,025 M pH 4,6 ; 30° C ; 8,5 ml	AR/mg
Cellulose (4)	0,4 % : CM-cellulose (NBC)	idem	AR/mg
Phosphatidase	Lécithine de soja (technique de TSENG et BATEMAN, 1969)		
Isocitratylase	Méthode de MAXWELL et BATEMAN (1968a)		μ M/min/mg
Glyoxylate-déshydrogénase	Technique de MAXWELL et BATEMAN (1968b)		μ M/min/mg

volume de la prise d'essai est diminué de telle sorte que la réaction ait lieu dans des conditions où il existe une double proportionnalité entre la quantité de substrat transformé en fonction du temps et la quantité d'enzyme mise en œuvre. De plus, ces conditions sont telles qu'au maximum 5 % du substrat est transformé au cours de la réaction (excepté pour la β -N-acétylglucosaminidase : 15 % du substrat).

Afin de permettre une étude comparative des capacités de synthèse et d'excrétion enzymatiques des deux organismes ou des différents types mycéliens, toutes les activités sont rapportées à la quan-

tité totale de protéines solubles extractibles, indice de la quantité de matière vivante synthétisée par le champignon.

Lors de certaines expériences nous avons pu nous contenter d'exprimer les activités en « unités par millilitre de solution enzymatique ». Chaque fois que ce cas se présentera il en sera fait mention soit dans le texte soit dans la légende des tableaux ou des figures.

6) Les produits chimiques dont l'origine n'est pas précisée (sels minéraux, HCl, TRIS ...) sont des produits MERCK (qualité « pour analyse »).

VI. — DOSAGES DIVERS.

Protéines.

Les protéines d'un volume donné d'extrait mycélien sont précipitées par de l'acide trichloracétique à 10% en concentration finale (30 min à 0 °C). Après centrifugation, le culot est lavé à deux reprises par de l'acide trichloracétique à 5%. Le culot protéique final est mis en solution dans un volume déterminé de soude normale. La quantité de protéines contenues dans cette solution est estimée selon la technique de LOWRY *et al.* (1951).

Acide oxalique.

L'acide oxalique est dosé par manganimétrie.

VII. — CHROMATOGRAPHIE SUR COLONNE DE DEAE-CELLULOSE.

Le milieu d'une culture du *L. lignosus* est purifié par filtration sur verre fritté n° 3 suivie d'une centrifugation de 10 min à 30 000 × g. 400 ml de ce filtrat sont déposés au sommet d'une colonne (Ø : 2 cm, h : 9 cm) de DEAE-cellulose (WHATMAN, DE 11) préalablement équilibrée dans un tampon phosphate 0,025 M pH 6. Lorsque tout le filtrat s'est écoulé, la colonne est lavée avec le tampon d'équilibrage. Les protéines fixées sur l'échangeur d'ions sont ensuite éluées à l'aide d'un gradient linéaire de concentration en phosphate de potassium allant de 0,025 M pH 6 à 0,5 M pH 6 dont le volume total est égal à 500 ml. La vitesse d'éluotion est réglée à 45 ml par heure. L'éluat est recueilli par fractions de 6 ml. L'éluotion achevée, une fraction sur deux est testée quant à son activité oxydante à l'égard du gaïacol et de la DOPA. Un troisième test est effectué dans le but de détecter une éventuelle peroxydase.

RÉSULTATS ET DISCUSSION

A. — ÉTUDE COMPARATIVE DES ENZYMES EXCRÉTÉES PAR LE *C. rolfii* ET LE *L. lignosus*.

1. Inventaire et rôle des enzymes libérées par les deux champignons.

En raison de la spécialisation parasitaire particulière de chaque organisme, nous avons utilisé deux milieux de culture, l'un préparé à partir de filets de haricot, l'autre à base de sciure d'hévéa. Les deux champignons ont été cultivés sur l'un et l'autre milieu et leurs aptitudes excrétrices mesurées dans les deux cas. Cette démarche s'avère indispensable pour mener une étude comparative valable. En effet, les enzymes extracellulaires étant le plus souvent inductibles (ALBERSHEIM *et al.*, 1969; ZÜCKER et HANKIN, 1970; TRIQUE, 1971), leur synthèse et leur excré-

TABLEAU II

Activité (*) des enzymes excrétées par le *C. rolfsii* et le *L. lignosus*

Enzymes	Milieu haricot		Milieu hévéa	
	<i>C. rolfsii</i>	<i>L. lignosus</i>	<i>C. rolfsii</i>	<i>L. lignosus</i>
Phosphatase	523	9	120	ε
Phosphodiesterase	76	0	92	0
α-glucosidase	420	1,8	152	0
β-glucosidase	11	65	4	70
β-galactosidase	52	8	4,3	124
β-N-acétylglucosaminidase	6,2	13	4	48
RNase	255	0	343	0
Phosphatidase	(+)	—	—	—
Pectinase	520	0	—	0
Cellulase	960	20	550	130
Phénoloxydase	DOPA	0	184	0
	Gaïacol	0	460	0
				1620

(*) Rapportée à la croissance mycélienne estimée comme indiqué au paragraphe V.

sont fortement tributaires de la composition du milieu supportant la croissance des parasites.

Afin de faciliter l'interprétation des résultats (tableau II), les différentes enzymes sont classées en deux catégories : les hydrolases et les phénoloxydases.

Hydrolases.

Le *C. rolfsii* excrète très activement non seulement des enzymes cellulolytiques et pectinolytiques mais également une gamme étendue d'hydrolases diverses. L'intervention des deux premières dans les processus parasitaires est précoce puisqu'elles sont responsables de la dégradation de deux éléments structuraux fondamentaux des cellules et tissus de la plante-hôte. L'intervention, dans ces mêmes processus, des autres enzymes identifiées paraît secondaire. En particulier il n'est pas possible d'attribuer un rôle analogue à la RNase, dont l'activité dans les filtrats de culture est loin d'être négligeable, les parois végétales ne comportant qu'une fraction polyribonucléotidique extrêmement réduite (KIVILAAN *et al.*, 1959; PHETHEAN et HALLAWAY, 1965). De même, il est possible que les différentes osidases, en prenant le relais des polyosides hydrolases, n'interviennent que pour rendre assimilables les éléments structuraux de l'hôte en parachevant la dégradation en monomères des polysaccharides originels.

Cependant nous avons pu vérifier que, cultivé sur bouillon de haricot complétement en glucose à 1,25 % en concentration finale, le *C. rolfsii* ne libère plus ces enzymes, à l'exception de la RNase et de la phosphatase, qu'en très faible quantité. Il apparaît donc que la synthèse et l'excrétion de la majorité des enzymes testées

puissent être régulées par « effet glucose ». Le phénomène observé est réellement une répression catabolique puisque dans les conditions expérimentales utilisées seule l'activité de l' α - et de la β -glucosidase est inhibée, partiellement, par le glucose. Aussi peut-on considérer que certaines osidases pourraient intervenir dans la régulation de la synthèse des autres enzymes extracellulaires en libérant des monosaccharides qui, s'ils ne sont pas immédiatement assimilés par le parasite, réprimeraient la synthèse de ces enzymes.

Cette hypothèse a pu être vérifiée par PATIL et DIMOND (1968). Ces chercheurs ont, en effet, réussi à réduire les symptômes du « Wilt » de la tomate en administrant du glucose ou de l'acide galacturonique au niveau d'une entaille pratiquée dans les tiges de plants infectés par le *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*.

Cependant les différentes osidases jouent probablement un rôle plus déterminant dans l'établissement du processus infectieux. Dans le cas du couple hôte-parasite, haricot-*Colletotrichum lindemuthianum* il a pu être démontré que la virulence du parasite est liée à la production d'une α -galactosidase (ENGLISH et ALBERSHEIM, 1969; ALBERSHEIM *et al.*, 1969). Les relations sont complexes puisque la production de cette enzyme par le parasite dépend de nombreux facteurs dont la composition en polysaccharides des parois de l'hôte (ENGLISH *et al.*, 1971). Par ailleurs des études récentes ont montré que l'hôte est capable de produire des protéines inhibant certaines enzymes du parasite (ALBERSHEIM et ANDERSON, 1971; FISCHER *et al.*, 1972). A l'inverse, le parasite peut libérer des protéines inhibant certaines enzymes de l'hôte susceptibles de limiter l'invasion par lyse de la paroi mycélienne (ALBERSHEIM et VALENT, 1974).

Le *L. lignosus* libère également un certain nombre d'hydrolases. Cependant chez ce champignon l'excrétion enzymatique se situe, qualitativement, et souvent quantitativement, à un niveau plus bas que chez le *C. rolfsii*.

Enfin, si l'on examine l'aspect quantitatif du phénomène, il apparaît que le bouillon de haricot présente, pour la plupart des enzymes étudiées, un effet inducteur plus marqué que le milieu hévéa.

Phénoloxydases.

C'est au niveau de leurs aptitudes respectives à excréter des phénoloxydases que nous enregistrons une différence fondamentale entre les deux parasites (tableau II). Quel que soit le milieu de culture utilisé, le *L. lignosus* se révèle seul capable de libérer ces enzymes. Il convient de souligner que l'absence d'excrétion, par le *C. rolfsii*, de toute phénoloxydase n'est pas imputable à une éventuelle déficience génétique puisque les extraits mycéliens et surtout les extraits de sclérotés présentent une activité DOPA-oxydasiqne élevée (résultats non publiés).

Divers travaux ont mis en lumière le rôle de premier plan joué par les phénoloxydases dans la dégradation de la lignine. En fait, parmi les enzymes de ce type, seule la para-diphényloxydase, ou laccase, exerce une activité dépolymérisante sur la lignine (HIGUCHI, 1953, cité par SCHUBERT, 1965). Cette observation a été confirmée par KIRK *et al.* (1968 a et b) qui par ailleurs ont précisé les mécanismes réactionnels mis en jeu.

Pour la suite de nos expériences il était donc primordial de préciser la nature des phénoloxydases excrétées par le *L. lignosus* et de vérifier que c'est bien une laccase que nous décelons. Dans ce but nous avons recherché la spécificité enzymatique en examinant l'action du filtrat de culture sur un certain nombre de composés phénoliques. Les produits d'oxydation ont été estimés par la mesure de

leur absorption à 420 nm. Cette longueur d'onde ne correspond pas nécessairement à celle du maximum d'absorption des différents produits de réaction, mais permet de les mettre en évidence.

Les résultats (tableau III) nous permettent de conclure en la présence d'une laccase et en l'absence d'une tyrosinase. Si l'on adopte la définition de la laccase d'après SCHUBERT (1965) complétée par les données de KIRK *et al.* (1968 *a* et *b*) il apparaît que cette enzyme est capable d'oxyder l'ensemble des substrats sur lesquels le filtrat de culture s'est révélé actif.

TABLEAU III

Action du filtrat de culture de L. lignosus sur divers composés phénoliques

Composés phénoliques (*)	Réaction d'oxydation (**)
Tyrosine	(-)
<i>p</i> -crésol	(-)
α -naphтол	(+ +)
DOPA	(+ †)
Catéchol	(+ +)
Hydroquinone	(+)
1,3-naphталène-diol	(+ + +)
Gaïacol	(+ + +)
Pyrogallol	(+ +)

(*) Substrat à 0,2 % en concentration finale dans le milieu réactionnel.

(**) (-) : composé phénolique non oxydable; (+) substrat oxydable, le nombre de (+) fournit une indication sur la vitesse relative d'oxydation des différents composés.

Nous avons également recherché l'existence d'une éventuelle peroxydase. A cet effet nous avons comparé la cinétique d'oxydation du gaïacol en présence et absence d'eau oxygénée. Il s'est avéré que non seulement l'eau oxygénée n'active pas mais au contraire réduit la vitesse d'oxydation du composé phénolique.

Certains pourridiés blancs étant réputés excréter de l'eau oxygénée (KOENIGS, 1970, 1972) nous avons préincubé les filtrats de culture en présence de catalase purifiée (BOEHRINGER). Un tel traitement ne modifie pas l'activité oxydante du filtrat à l'égard du gaïacol.

Enfin nous avons entrepris des expériences de fractionnement des protéines extracellulaires par chromatographie sur colonne de DEAE-cellulose (*fig. 1*). Une fraction sur deux a été testée quant à son activité sur la DOPA et le gaïacol, ce dernier en présence ou non d'eau oxygénée. Ce procédé nous a permis d'identifier deux phénoloxydases (que nous nommons respectivement L_1 et L_2 suivant leur ordre d'éluion) présentant, qualitativement, les mêmes caractéristiques : les deux protéines enzymatiques sont capables d'oxyder à la fois la DOPA et le gaïacol, cette dernière réaction étant, dans les deux cas, partiellement inhibée par l'eau oxygénée.

L'ensemble de ces données conduit à penser que le *L. lignosus* libère deux laccases à l'exclusion de toute autre phénoloxydase et de toute peroxydase. Au cours de notre étude, c'est donc bien l'enzyme impliquée dans la dépolymérisation de la lignine que nous avons appréciée.

De ces expériences il ressort que les deux parasites diffèrent non pas tant sur le plan de leur capacité à excréter des hydrolases, mais bien plus fondamentalement au niveau de leur aptitude à libérer des laccases.

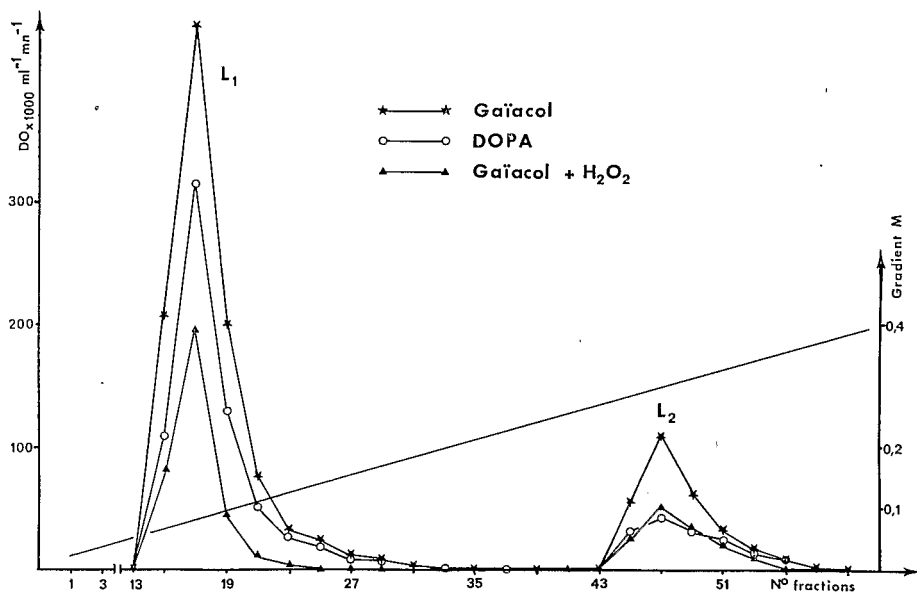


FIG. 1. — *L. lignosus*. Séparation de deux laccases extracellulaires par chromatographie sur colonne de DEAE-cellulose.

2. Évolution des activités enzymatiques au sein des filtrats en fonction de l'âge des cultures.

Les résultats que nous venons d'exposer ont été acquis au cours d'expériences menées à un âge déterminé du thalle des champignons. Rien ne nous permet d'affirmer qu'au cours du temps cette situation demeure inchangée. Aussi avons-nous suivi l'évolution de l'excrétion enzymatique en fonction de l'âge des cultures.

Chez le *C. rolfssii* (fig. 2 A et B) l'activité des hydrolases extracellulaires augmente très rapidement jusqu'au huitième ou quinzième jour selon l'enzyme considérée. En revanche le champignon ne libère à aucun moment une quelconque phénoloxydase.

Chez le *L. lignosus* (fig. 3 A et B) l'activité des laccases est nettement prédominante. Elle se manifeste très tôt et croît régulièrement jusqu'au 28^e jour. Celle des hydrolases suit une évolution parallèle tout en se cantonnant à des niveaux plus modestes. Seule l'excrétion de la cellulase présente une évolution particulière puisque l'activité de cette enzyme ne s'accroît de façon notable que vers le 28^e jour. Durant toute la période considérée certaines activités sont demeurées nulles (α -glucosidase) ou pratiquement indosables (phosphodiesterase, RNase, pectinase).

Si cette étude de l'excrétion enzymatique en fonction de l'âge des cultures ne nous a pas apporté de renseignements originaux, il n'en va pas de même en ce qui

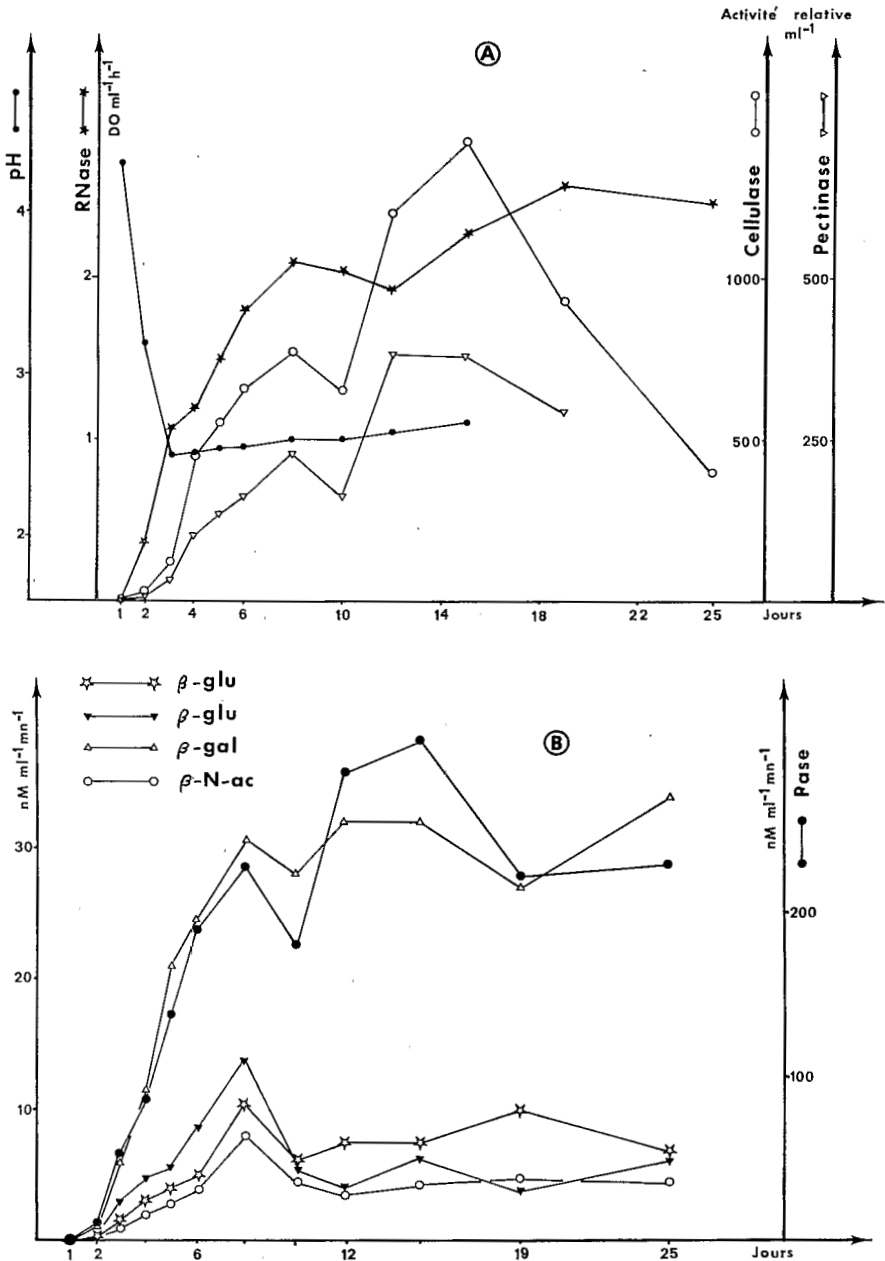


FIG. 2 A et B. — *C. rolf sii*. Évolution de l'activité des enzymes extracellulaires en fonction de l'âge des cultures.

Note : les activités enzymatiques enregistrées au temps (t) correspondent à la valeur de l'activité au temps ($t-1$) augmentée de celle des enzymes excrétées entre les temps ($t-1$) et (t) et diminuée de la perte d'activité due soit à une dégradation des enzymes par une protéase, soit à l'instabilité des enzymes elles-mêmes. (Cette remarque est également valable pour les figures 3 A et B.)

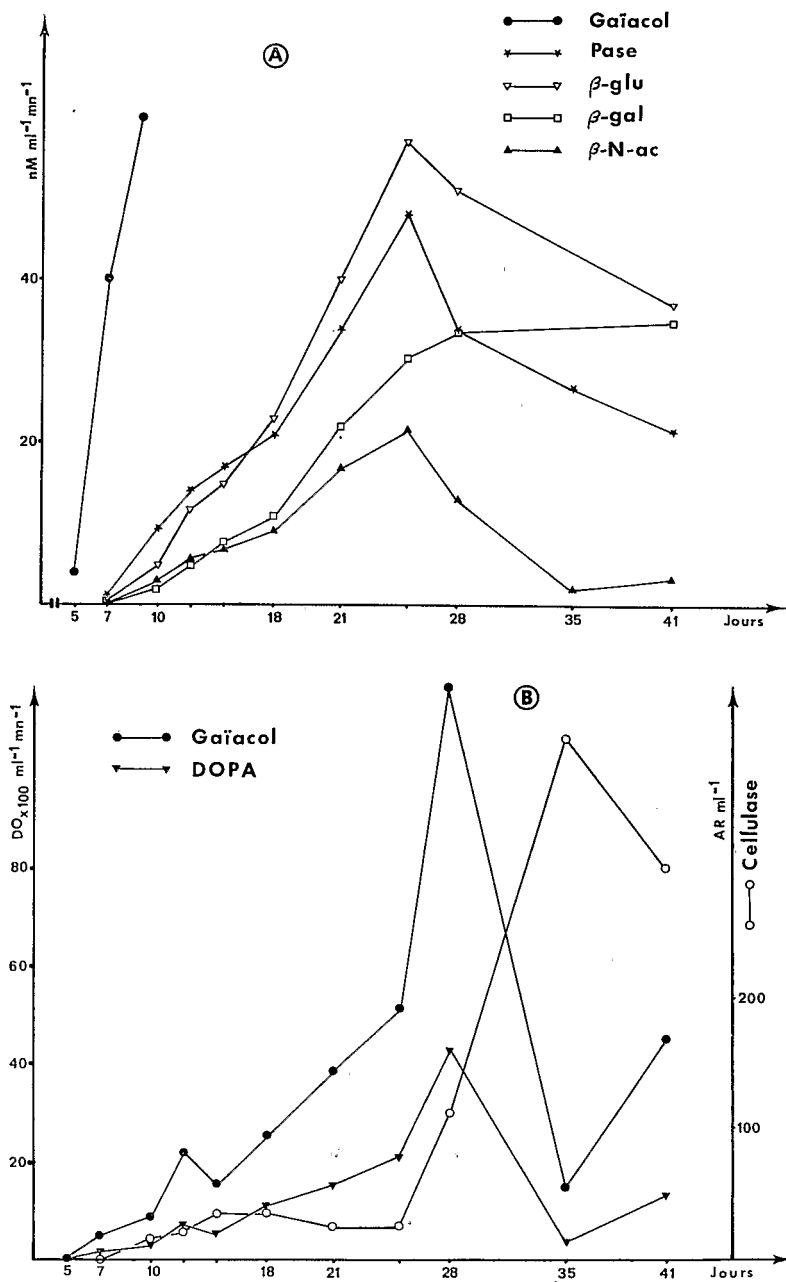


FIG. 3 A et B. — *L. lignosus*. Évolution de l'activité des enzymes extracellulaires en fonction de l'âge des cultures.

Note : sur la figure 3 A l'activité de la laccase (courbe « gaïacol ») est exprimée en nMoles/ml/min afin de mieux faire apparaître la très grande différence entre l'activité de cette enzyme et celle des hydrolases. Les valeurs ont été calculées en supposant que le tétragaïacol ($E_{430\text{ nm}} = 6,4 \times 10^3 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$) est le seul produit apparu au cours de la réaction enzymatique, ce qui n'est pas nécessairement le cas. Les valeurs fournies ne sont donc qu'indicatives. Sur la figure 3 B l'activité de la laccase est exprimée en $\text{DO}_{x100} \text{ ml}^{-1} \text{ min}^{-1}$.

concerne l'évolution du pH des milieux de culture. Le *L. lignosus* ne modifie pas sensiblement le pH de ses substrats. Celui-ci se maintient entre les pH 5,5 et 6,0. En revanche le *C. rolfsii* excrète suffisamment d'acide oxalique pour amener, dès le 3^e jour de culture, le pH de son milieu à une valeur moyenne égale à 2,5. Au cours de cette brève période: la concentration en acide oxalique atteint 2 mg par millilitre. A compter du 5^e jour l'acidité du milieu diminue très progressivement (pH 3,5 le 15^e jour).

Les données que nous avons obtenues au cours de cette étude en fonction de l'âge des cultures confirment les résultats enregistrés plus haut. Les deux agents pathogènes présentent *in vitro* des capacités d'excrétion enzymatique très différentes, caractérisées par la seule libération d'hydrolases chez le *C. rolfsii* et la prédominance des laccases chez le *L. lignosus*. Ces caractéristiques ne sauraient qu'influer sur le comportement parasitaire des deux champignons. Elles permettent, dans une certaine mesure, de rendre compte du type de matériel végétal attaqué suivant que le parasite excrète ou non des laccases lui conférant ou non la possibilité de dépolymériser la lignine.

B. — INFLUENCE DU pH ET DE QUELQUES CATIONS DIVALENTS SUR L'ACTIVITÉ DES ENZYMES EXTRACELLULAIRES.

Un autre aspect du phénomène pathologique ne doit pas être négligé : les enzymes actives sur les tissus de l'hôte sont libérées dans un milieu présentant certaines caractéristiques physicochimiques et c'est au sein de ce milieu qu'elles doivent exercer leur activité. Aussi avons-nous étudié l'influence du pH et de quelques cations sur l'activité des phénoloxydases et des hydrolases extracellulaires.

1. Influence du pH sur quelques activités enzymatiques.

L'activité en fonction du pH des hydrolases excrétées par le *C. rolfsii* a été mesurée en utilisant comme source d'enzymes une « poudre acétonique » préparée à partir d'un filtrat de culture et remise en solution dans de l'eau distillée. Celle des hydrolases libérées par le *L. lignosus* a été étudiée sur un filtrat de culture préalablement concentré par dialyse contre du polyéthylène-glycol. Enfin l'étude des laccases a été réalisée sur les deux fractions séparées par chromatographie sur DEAE-cellulose (laccases L₁ et L₂).

Les hydrolases excrétées par le *C. rolfsii* présentent toutes une activité optimale en milieu acide : pH 2,6 à 4,0 suivant l'enzyme considérée (fig. 4). Apparemment, il s'agit d'une caractéristique commune à toutes les hydrolases libérées par ce parasite. En effet, les enzymes dégradant la cellulose (BATEMAN, 1969), la pectine (BATEMAN et BEER, 1965), le xylane, galactane et galactomannane (VAN ETEN et BATEMAN, 1969), les arabanes (COLE et BATEMAN, 1969) et les phospholipides (TSENG et BATEMAN, 1969) fonctionnent, elles aussi, de façon optimale dans la zone acide de pH : 3,0 à 4,5. Compte tenu de la faible acidité des tissus végétaux (pH 5,5 à 6,0 dans le cas de l'hypocotyle de haricot, un des hôtes privilégiés de ce parasite), on serait tenté de considérer que le champignon se trouve dans l'incapacité d'utiliser ses armes dans des conditions optimales. Il n'en est rien puisque, par son aptitude à excréter des quantités importantes d'acide oxalique, le parasite possède la faculté d'acidifier le milieu externe, tant *in vitro* qu'*in vivo* (BATEMAN et BEER, 1965).

Une remarque particulière concerne l'activité en fonction du pH de la β -N-acétylglucosaminidase. L'étude met en évidence deux pH optimaux différents pour cette enzyme. Ceci suggère la présence dans le filtrat de culture non pas d'une seule

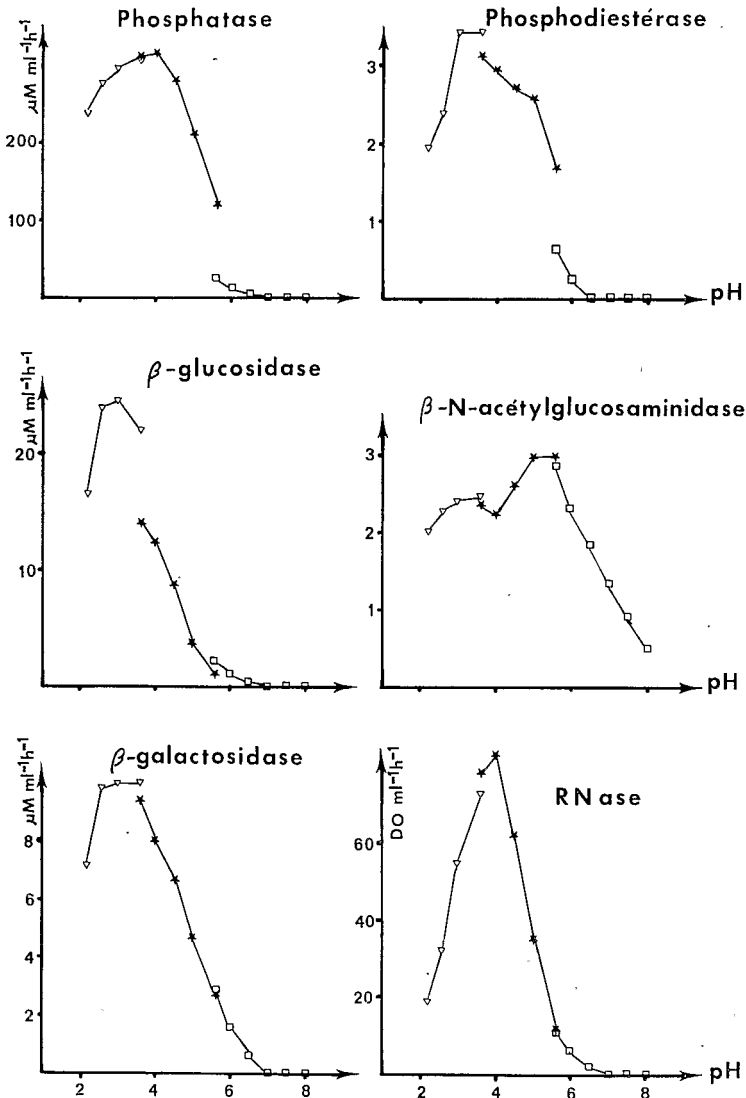


FIG. 4. — *C. rolfssii*. Activité, en fonction du pH, de quelques enzymes extracellulaires.

mais de deux protéines ayant la même spécificité enzymatique. De fait des expériences de chromatographie de protéines sur colonne de DEAE-cellulose nous ont permis d'identifier deux β -N-acétylglucosaminidases ainsi que quatre RNases et deux phosphodiesterases.

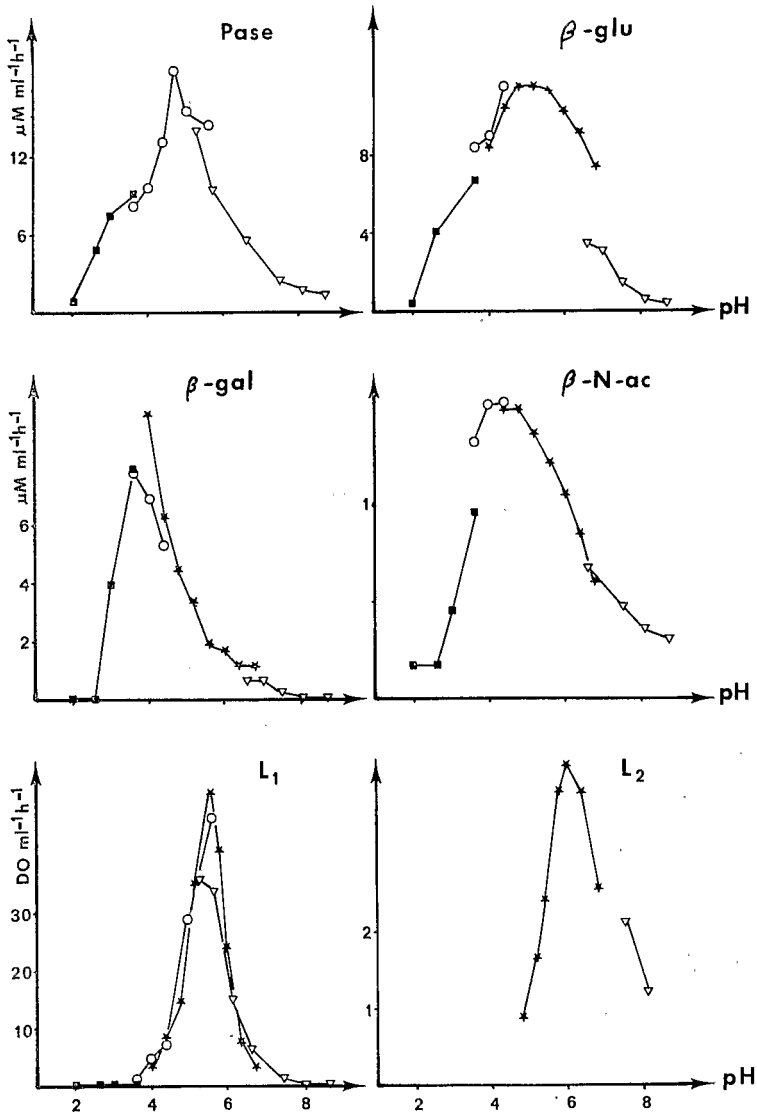


FIG. 5. — *L. lignosus*. Activité, en fonction du pH, des enzymes extracellulaires.

L'activité des deux laccases excrétées par le *L. lignosus* est optimale à pH 5,6 pour l'une (L_1) et pH 6,0 pour l'autre (L_2) (fig. 5). On remarque que le pH optimum de ces deux enzymes correspond au pH auquel se maintient le milieu supportant la croissance du champignon. En revanche les quatre hydrolases étudiées présentent une activité maximale dans une zone plus acide des pH (fig. 5).

2. Influence de quelques cations divalents et de l'EDTA.

Pour apprécier leur effet sur l'activité des différentes enzymes extracellulaires, ces substances ont été introduites en concentrations variables dans les milieux réactionnels. Pour les hydrolases du *C. rolfsii* la solution enzymatique (poudre

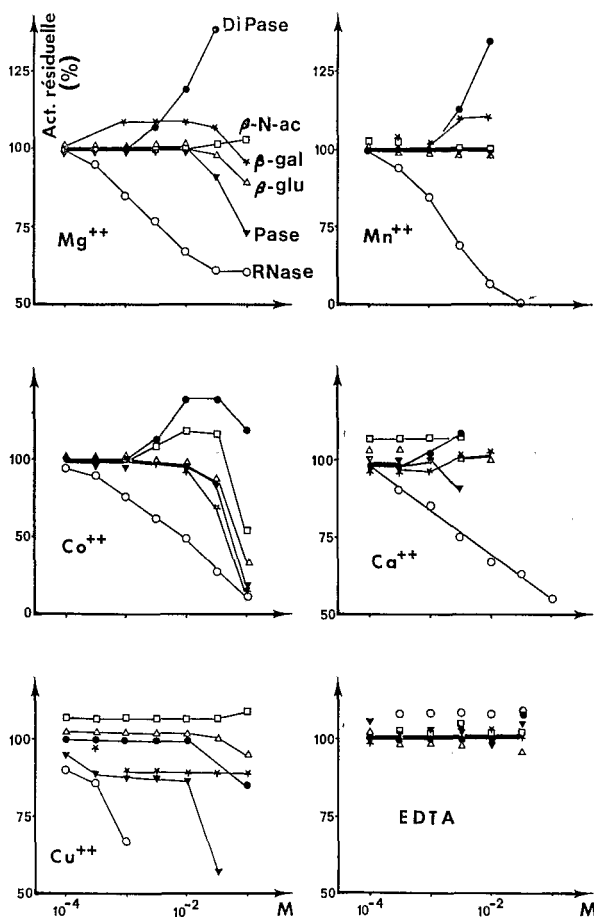


FIG. 6. — *C. rolfsii*. Effet de cations divalents et de l'EDTA sur l'activité des hydrolases extracellulaires.

acétonique dissoute dans de l'eau distillée) est préalablement dialysée de façon exhaustive contre une solution tamponnée acétate-acide acétique 0,02 M pH 4. La source de laccases est constituée par les fractions enzymatiques L₁ et L₂ isolées par chromatographie sur DEAE-cellulose.

Dans l'ensemble, les cations divalents en concentration inférieure ou égale à 10⁻² M n'exercent pratiquement aucun effet sur l'activité des six hydrolases du

C. rolfsii (fig. 6). A des molarités supérieures, leur influence, encore que modeste, devient néanmoins sensible. Deux exceptions sont à signaler : d'une part la RNase s'avère plus sensible que les autres enzymes à la présence des différents ions et, d'autre part, le cobalt exerce une inhibition nettement plus marquée que les autres ions sur l'ensemble des activités enzymatiques (excepté sur la phosphodiesterase). Enfin l'EDTA demeure sans effet, même à une concentration égale à 10^{-2} M.

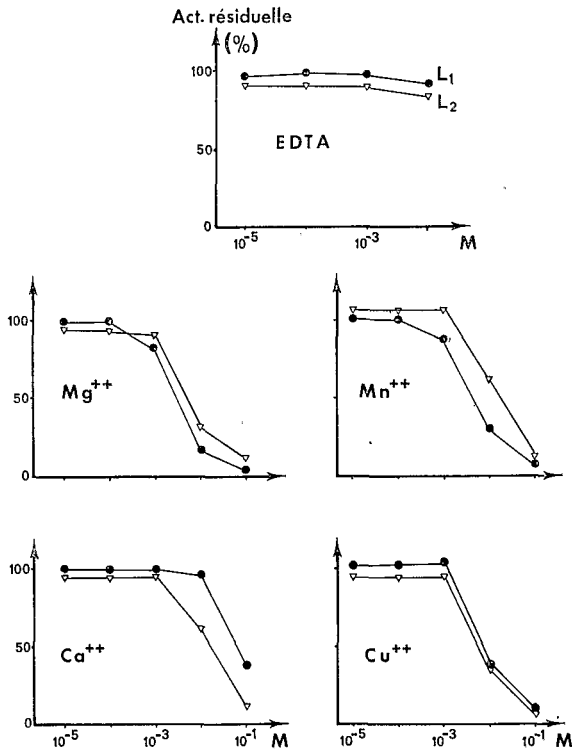


FIG. 7. — *L. lignosus*. Effet de cations divalents et de l'EDTA sur l'activité des laccases extracellulaires.

Étant donné les quantités de cations minéraux habituellement présentes dans les tissus végétaux, ces ions ne devraient exercer ni inhibition, ni activation sur les différentes activités enzymatiques étudiées. Cependant il ne convient pas d'extrapoler ce résultat à l'ensemble des enzymes libérées par le *C. rolfsii*. En effet, selon BATEMAN et BEER (1965), la complexation des ions calciques par l'acide oxalique conditionne très largement l'activité de la polygalacturonase et, partant, l'expression du pouvoir pathogène du champignon.

Une étude analogue effectuée sur les laccases excrétées par le *L. lignosus* nous a conduit à des résultats similaires (fig. 7). L'activité de ces enzymes n'est inhibée de façon efficace qu'en présence de concentrations élevées et non physiologiques en cations divalents.

C. — SPÉCIALISATION PARASITAIRE DES ÉLÉMENTS DU THALLE DES DEUX CHAMPIGNONS.

Chez les deux parasites une séquence d'événements morphogénétiques identique préside à l'édification du thalle. Chaque phase de développement est caractérisée par la mise en place d'un type mycélien particulier spécialisé, *in vitro*, soit dans l'exploitation du substrat (mycélium intramatriciel), soit dans l'extension superficielle du thalle (hyphes conductrices et de type B). Par ailleurs, *in vivo*, le *C. rolfsii* ne progresse au sein des tissus de l'hôte qu'au moyen de sa forme mycélienne intramatricielle. Aussi avons-nous recherché d'une part, si, chez le *C. rolfsii*, la différence de comportement parasitaire des deux types mycéliens était liée à une différence dans leurs capacités respectives d'excrétion enzymatique et, d'autre part, si, chez le *L. lignosus*, il était possible de mettre en évidence une spécialisation analogue des divers éléments du thalle. Dans ce but nous avons évalué les aptitudes excrétrices des formes mycéliennes de chaque parasite.

1. *Corticium rolfsii*.

Chez le *C. rolfsii*, ces recherches n'ont pas porté uniquement sur les hydrolases déjà répertoriées, mais également, en raison du rôle privilégié joué par l'acide oxalique dans l'expression du pouvoir pathogène, sur deux enzymes intracellulaires de la voie métabolique conduisant à la synthèse de cet acide : l'isocitrate lyase et la glyoxylate déshydrogénase.

TABLEAU IV

Activité des enzymes excrétées par les différents types mycéliens du thalle du *Corticium rolfsii* (1)

ENZYMES (extracellulaires)	Mycélium conducteur (C)	Mycélium latéral (L) (intramatriciel)	L/C (2)
Pase	445	4 160	9
DiPase	2,6	16,5	6
RNase	4,8	113	25
β -glu	290	260	0,9
β -gal	17,6	200	11
β -N-ac	9,4	306	32
Pectinase	148	1 121	8
Cellulase	70	13 220	190
Pox { DOPA	0	0	—
{ Gaïacol	0	0	—

(1) Activité rapportée à la croissance mycélienne estimée comme indiquée au paragraphe V (matériel et méthodes).

(2) L/C : rapport de l'activité des enzymes excrétées par les hyphes intramatricielles sur celle des enzymes homologues libérées par les filaments conducteurs.

TABLEAU V

Corticium rolsii : activité spécifique de l'isocitrate lyase
et de la glyoxylate déshydrogénase (intracellulaires)

ENZYMES	Mycélium latéral	Mycélium conducteur
Isocitrate lyase	0,03	0
Glyoxylate déshydrogénase	0,13	0

Le tableau IV permet d'apprécier les différences entre les activités des enzymes excrétées par les deux types mycéliens. En effet, pour toutes les hydrolases extracellulaires étudiées, exceptée la β -glucosidase, le rapport L/C est très supérieur à l'unité. Il en ressort que ces enzymes sont libérées bien plus activement (10 à 30 fois pour la plupart d'entre elles; près de 200 fois en ce qui concerne la cellulase) par les hyphes intramatriciels que par les hyphes conductrices. Par ailleurs (tableau V) seuls les filaments intramatriciels synthétisent l'isocitrate lyase et la glyoxylate déshydrogénase autorisant l'accumulation de l'acide oxalique. Ce dernier résultat est confirmé par les dosages de l'oxalate, les filtrats de culture des hyphes latérales (80 mg/mg de protéines mycéliennes) et la solution de lavage des filaments conducteurs (0 mg).

Ces données font ressortir le rôle primordial joué par les hyphes intramatriciels dans les mécanismes du parasitisme. Elles seules sont responsables du pouvoir pathogène du champignon non seulement en raison de leurs aptitudes respiratoires particulières mais encore en raison de leur capacité à excréter activement l'ensemble des armes enzymatiques. Cet arsenal comporte à la fois des hydrolases responsables de la dégradation de la plupart des molécules structurales des tissus de l'hôte et un acide organique favorisant l'action des précédentes, d'une part, en modifiant de façon adéquate le pH du milieu colonisé et, d'autre part, en complexant les ions calcium inhibiteurs, selon BATEMAN et BEER (1955), des polygalacturonases. L'intervention de l'acide oxalique est d'autant plus efficace que, à l'instar des enzymes extracellulaires, il est excrété à l'endroit précis où son action est requise. Bien qu'apparemment dépourvus de tout pouvoir infectieux, les filaments conducteurs jouent un rôle non négligeable puisque, en raison de leur vitesse d'allongement élevée, ils autorisent une colonisation rapide de la surface de l'hôte et donc une multiplication des points de pénétration du parasite.

2. *Leptoporus lignosus*.

Le tableau VI fait état des résultats obtenus chez le *Leptoporus lignosus*.

Dans l'ensemble aucun des types mycéliens n'excrète activement l'une ou l'autre enzyme hydrolytique. De plus, à l'exception de la phosphatase et de la β -N-acétylglucosaminidase, ces enzymes sont libérées à un niveau comparable par les filaments A et B. Dans les conditions expérimentales décrites ces deux formes mycéliennes n'excrètent pratiquement aucune des hydrolases suivantes : phosphodiesterase, RNase, β -galactosidase, cellulase et pectinase. En cela le comportement

du *L. lignosus* diffère notablement de celui du *C. rolfsii* dont les filaments intramatriels libèrent ces enzymes très rapidement et en quantités importantes. Il paraît donc légitime d'émettre quelque réserve quant à l'intervention effective des hydrolases dans les processus parasitaires chez le *L. lignosus*, au moins aux premiers stades de l'infection.

TABLEAU VI

Activité des enzymes excrétées par les différents types mycéliens du thalle du *Leptoporus lignosus* (1)

ENZYMES (extracellulaires)	Mycélium agrégé (2)	Mycélium Type B	Mycélium Type A (intramatriciel)	A/B
Pase	8	27	ε	—
DiPase	0	0	0	—
RNase	0,4	—	0	—
β-glu	7,6	7,8	17	2
β-gal	1	0	0	—
β-N-ac	1,4	3,7	17	4
Cellulase	ε	ε	ε	—
Pectinase	0	0	0	—
Pox { DOPA	8	39	697	17
{ Gaïacol	9	33	2 820	85

(1) Activité rapportée à la croissance mycélienne estimée comme indiqué au paragraphe V (matériel et méthodes).

(2) Activité exprimée en nombre d'unités par culture.

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

Les résultats sont très différents en ce qui concerne les laccases dont le rôle fondamental dans la dépolymérisation de la lignine et, partant, dans la spécialisation parasitaire du champignon a été évoqué plus haut. Il en ressort que, parmi les trois formes mycéliennes constitutives du thalle du *L. lignosus*, la forme A, intramatrielle, doit seule être infectieuse puisque seule apte à libérer abondamment ce type d'enzyme. Quant aux filaments B, leur intervention se limite vraisemblablement à assurer l'extension rapide du thalle à la surface de l'hôte et la transition entre les hyphes latérales et les structures agrégées. Ces dernières, bien que non infectieuses selon des critères purement biochimiques, jouent un rôle néanmoins important puisqu'elles permettent au champignon de progresser de souche en souche et, de ce fait, assurent sa dissémination et l'extension des foyers d'infection.

CONCLUSION

Les *C. rolfsii* et *L. lignosus* présentent de nombreuses analogies, tant sur le plan de leur cycle de développement que sur celui des caractéristiques morphologiques des différents éléments de leur thalle. En revanche ils diffèrent considérablement quant à leur comportement parasitaire. Par ailleurs, au moins chez le *C. rolfsii*, les divers éléments du thalle ne paraissent pas remplir des rôles identiques dans l'établissement et le développement des relations hôte-parasite.

Nous avons tenté de vérifier si ces particularités pouvaient être expliquées par des différences, d'une part, dans la nature des enzymes excrétées par chaque parasite et, d'autre part, au niveau des capacités de synthèse et d'excrétion enzymatiques de chaque type mycélien.

Les deux agents pathogènes présentent, *in vitro*, des capacités d'excrétion enzymatique qualitativement très différentes. Le *C. rolfsii* libère activement une gamme étendue d'hydrolases responsables de la dégradation de divers polymères, structuraux ou non, des tissus de plantes non ligneuses. Ces enzymes ont une activité optimale en milieu acide et se révèlent particulièrement peu sensibles à la présence de cations divalents. Le champignon excrète également des quantités appréciables d'acide oxalique. Cette aptitude ne saurait que favoriser l'expression du pouvoir pathogène, l'acidification des tissus qui en résulte autorisant une mise en œuvre optimale des enzymes extracellulaires.

Contrairement au *C. rolfsii*, le *L. lignosus* libère essentiellement des laccases exerçant une activité dépolymérisante sur la lignine. Le parasite a également la possibilité de dégrader la cellulose. Cependant il semble que l'activité cellulolytique se manifeste plus tardivement que la précédente.

Ces résultats montrent que chaque champignon excrète des enzymes lui permettant de dégrader une catégorie de biopolymères déterminée mais fondamentalement différente suivant l'organisme considéré. Ils mettent en évidence une corrélation étroite entre la nature des enzymes excrétées *in vitro* et le comportement parasitaire de chacun des organismes étudiés.

Enfin, nous avons pu montrer que, chez l'un et l'autre parasite, les enzymes sont libérées par les seules hyphes intramatricielles. Il en est de même pour l'acide oxalique synthétisé et libéré, chez le *C. rolfsii*, par cette seule forme mycélienne.

Ainsi les hyphes définies comme homologues, selon des critères morphologiques et morphogénétiques, remplissent, du point de vue des processus parasitaires, des fonctions identiques, le pouvoir pathogène étant détenu par les hyphes intramatricielles.

BIBLIOGRAPHIE

- ALBERSHEIM P. et ANDERSON A. J., 1969. — Proteins from plant cell walls inhibit polygalacturonases secreted by plant pathogens. *Proc. natl. Acad. Sci.*, **68**, 1815-1819.
- ALBERSHEIM P., JONES T. M. et ENGLISH P. D., 1969. — Biochemistry of the cell wall in relation to infective process. *Ann. Rev. Phytopathology*, **7**, 171-174.
- ALBERSHEIM P. et VALENT B. S., 1974. — Host-pathogen interactions. VII. Plant pathogens secrete proteins which inhibit enzymes of the host capable of attacking the pathogen. *Plant Physiol.*, **53**, 684-687.

- BATEMAN D. F., 1969. — Characteristics of the cellulase system produced by *Sclerotium rolfsii* Sacc. *Phytopathology*, **59**, 37-42.
- BATEMAN D. F. et BEER S. V., 1965. — Simultaneous production and synergistic action of oxalic acid and polygalacturonase during pathogenesis by *Sclerotium rolfsii*. *Phytopathology*, **55**, 204-211.
- BATEMAN D. F. et MILLAR R. L., 1966. — Pectic enzymes in tissue degradation. *Ann. Rev. Phytopathology*, **4**, 119-146.
- BOISSON C., 1968 a. — Mise en évidence de deux phases mycéliennes successives au cours du développement du *Leptoporus lignosus* (Kl.) Heim. *C. R. Acad. Sc.*, **D**, **266**, 1112-1115.
- BOISSON C., 1968 b. — Modalités du franchissement d'une étape de son développement par le *Leptoporus lignosus* (Kl.) Heim. *C. R. Acad. Sc.*, **D**, **267**, 1435-1438.
- BOISSON C., 1973. — De la basidiospore au rhizomorphe, déterminisme de l'agrégation chez le Basidiomycète *Leptoporus lignosus* (Kl.) Heim ex Pat. *Thèse Doct. État (Sci. nat.)* Paris-Sud.
- BOISSON C. et GOUJON M., 1969. — Comment l'étude de la morphogénèse des champignons à sclérotés et à rhizomorphes peut permettre d'aborder certains problèmes phytopathologiques importants en Côte-d'Ivoire. *J. of the West Afr. Sc. Association*, **14**, 89-93.
- COLE A. L. J. et BATEMAN D. F., 1969. — Arabanase production by *Sclerotium rolfsii* and its role in tissue maceration. *Phytopathology*, **59**, 1750-1753.
- ENGLISH P. D. et ALBERSHEIM P., 1969. — Host-pathogen interactions. I. A correlation between alphasgalactosidase production and virulence. *Plant Physiol.*, **44**, 217-224.
- ENGLISH P. D., JURALE J. B. et ALBERSHEIM P., 1971. — Host-pathogen interactions. II. Parameters affecting polysaccharide-degrading enzyme secretion by *Colletotrichum lindemuthianum* grown in culture. *Plant Physiol.*, **47**, 1-6.
- FISCHER M., ANDERSON A. et ALBERSHEIM P., 1972. — Lack of specificity of the *Colletotrichum lindemuthianum* endopolygalacturonase inhibitor. *Phytopathology*, **62**, 757.
- GOUJON M., 1966. — Mise en évidence d'un type fondamental d'hyphe chez le *Corticium rolfsii* (Sacc.) Curzi. Étude expérimentale de ses fonctions. *C. R. Acad. Sc.*, **D**, **263**, 1695-1698.
- GOUJON M., 1967. — Mise en évidence de trois phases distinctes dans le développement du *Corticium rolfsii* (Sacc.) Curzi en ce qui concerne la formation des sclérotés. *C. R. Acad. Sc.*, **D**, **264**, 2889-2891.
- GOUJON M., 1969. — Étude comparative du *Corticium rolfsii* (Sacc.) Curzi et du *Sclerotium coffeicola* Stahl. *Cah. Biol. ORSTOM*, **7**, 69-87.
- KIRK T. K., HARKIN J. M. et COWLING E. B., 1968 a. — Oxidation of galactyl and veratryl-glycerol-beta-galactyl ether by *Polyporus versicolor* and *Stereum frustulatum*. *Biochim. biophys. Acta*, **165**, 134-144.
- KIRK T. K., HARKIN J. M. et COWLING E. B., 1968 b. — Degradation of the lignin model compound Syrin glycol-beta-galactyl ether by *Polyporus versicolor* and *Stereum frustulatum*. *Biochim. biophys. Acta*, **165**, 145-163.
- KIVILAAN A., BEAMAN T. C. et BANDURSKI R. S., 1969. — A partial chemical characterization of maize coleoptil cell walls prepared with the aid of a continually renewable filter. *Nature*, **184**, 81-82.
- KOENIGS J. W., 1970. — Production of extracellular hydrogen peroxide and peroxidase by wood-rotting Basidiomycetes. *Phytopathology*, **60**, 1298.
- KOENIGS J. W., 1972. — Production of extracellular hydrogen peroxide and peroxidase by wood-rotting fungi. *Phytopathology*, **62**, 100-110.
- LANCE C., 1963. — Recherches sur la croissance et le métabolisme respiratoire de tissus végétaux normaux et tumoraux cultivés *in vitro*. *Thèse Doct. État (Sci. nat.)*, Paris, C. N. R. S., n° A. O. 4063.

- LOWRY O. H., ROSEBROUGH N. I., FARR A. L. et RANDALL R. J., 1951. — Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. biol. Chem.*, **193**, 265-275.
- MAXWELL D. P. et BATEMAN D. F., 1968 *a.* — Glucose metabolism in *Sclerotium rolfsii*. *Phytopathology*, **58**, 1630-1634.
- MAXWELL D. P. et BATEMAN D. F., 1968 *b.* — Oxalic biosynthesis by *Sclerotium rolfsii*. *Phytopathology*, **58**, 1635-1642.
- PATIL S. S. et DIMOND A. E., 1968. — Repression of polygalacturonase synthesis in *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* by sugars and its effect on symptom reduction in infected tomato plants. *Phytopathology*, **58**, 676-682.
- PHETHEAN P. O. et HALLAWAY M., 1965. — The detection of ribonucleic acid in plant cell walls. *Biochem. J.*, **96**, 9 p-10 p.
- PUJARNISCLE S., 1969. — Étude biochimique des lutoïdes d'*Hevea brasiliensis*, Müll. Arg. Différences et analogies avec les lysosomes. *Thèse Doct. État (Sci. nat.)*, Paris-Sud, C. N. R. S., n° A. O. 3379.
- SCHUBERT W., 1965. — *Lignin biochemistry*. Academic Press, New York.
- SCHUCHER R. et HOKIN L. E., 1954. — The synthesis and secretion of lipase and ribonuclease by pigeon pancreas slices. *J. biol. Chem.*, **210**, 551-557.
- TRIQUE B., 1971. — Propriétés des pectinases du *Fusarium oxysporum* f. sp. *eleaidis*. *Oléagineux*, **26**, 563-565.
- TSENG T. C. et BATEMAN D. F., 1969. — A phosphatidase produced by *Sclerotium rolfsii*. *Phytopathology*, **59**, 359-363.
- VAN ETTEN H. D. et BATEMAN D. F., 1969. — Enzymatic degradation of galactan, galactomannan and xylan by *S. rolfsii*. *Phytopathology*, **59**, 968-972.
- ZUCKER M. et HANKIN, 1970. — Regulation of pectate lyase synthesis. *J. Bacteriol.*, **104**, 13-18.