



HAL
open science

Aspects histologiques des interactions entre le puceron lanigère du peuplier et sa plante-hôte

France Dardeau, Elodie Deprost, Françoise Laurans, François Lieutier,
Aurélien Sallé

► **To cite this version:**

France Dardeau, Elodie Deprost, Françoise Laurans, François Lieutier, Aurélien Sallé. Aspects histologiques des interactions entre le puceron lanigère du peuplier et sa plante-hôte. *Symbioses*, 2013, 29, pp.23-29. hal-01268533

HAL Id: hal-01268533

<https://hal.science/hal-01268533>

Submitted on 29 May 2020

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Aspects histologiques des interactions entre le puceron lanigère du peuplier et sa plante-hôte

France DARDEAU*, Elodie DEPROST*, Françoise LAURANS**,
François LIEUTIER* & Aurélien SALLÉ*

Résumé. - Le puceron lanigère du peuplier, *Phloeomyzus passerinii*, est un ravageur important des peupleraies du sud de l'Europe, du Proche-Orient et d'Afrique du Nord. Après une insertion de ses stylets, à la fois intercellulaire et intracellulaire, il se nourrit exclusivement dans le parenchyme cortical du tronc des peupliers. Durant les pullulations, ce puceron cause des nécroses corticales étendues et un dessèchement des rameaux, pouvant conduire à la mort de l'arbre. Nous avons comparé la réaction corticale après blessure mécanique et après piqûre du puceron entre deux génotypes hybrides *Populus x canadensis* avec des niveaux de résistance contrastés ('1214' qui est sensible et '145/51' qui affecte les paramètres démographiques du puceron). Chaque semaine durant un mois, nous avons réalisé des coupes histologiques autour des zones d'insertion des stylets et des blessures mécaniques pour comparer les modifications anatomiques et biochimiques des tissus de l'écorce. Les blessures mécaniques ont induit des péridermes de blessures très localisés alors que l'alimentation du puceron a entraîné des réactions étendues, présentant des similarités avec un bourrelet cicatriciel, mais avec également des cellules hypertrophiées à parois minces, une localisation particulière des dépôts pariétaux de lignine et des accumulations périphériques de tanins et flavanols. Les dépôts de lignine étaient plus étendus et importants chez le génotype résistant. Notre hypothèse est que *P. passerinii*, avec son mode destructif de pénétration des tissus de son hôte, déclenche les mécanismes de défense du peuplier, puis les manipule pour induire la formation d'une pseudogalle.

Mots-clés. - Interactions plantes-Insectes ; Résistance ; Bourrelet cicatriciel ; Pseudogalle.

INTRODUCTION

Le puceron lanigère du peuplier, *Phloeomyzus passerinii* (Sign.) (Sternorrhyncha : Aphididae), se développe sur les troncs et grosses branches de peupliers matures. Cet insecte a été mentionné sur plusieurs espèces et hybrides du genre *Populus* mais semble préférer certains cultivars de peuplier noir, *Populus nigra*, et d'hybrides euraméricains, *Populus x canadensis* [LAPIETRA & ALLEGRO, 1990 ; SADEGHI *et al.*, 2007]. Dans ces plantations de cultivars sensibles, ses populations peuvent pulluler et causer alors des dommages importants. En France, il est considéré comme un ravageur émergent : bien que décrit dès le 19^e siècle, il y est resté très discret jusqu'au milieu des années 1990, époque depuis laquelle des pullulations ont été régulièrement observées dans les peupleraies cultivées. Initialement cantonnées au pourtour méditerranéen et au Sud-Ouest de la France, les pullulations se sont depuis progressivement étendues aux Régions Centre, Bourgogne et Pays de la Loire, et des colonies abondantes ont été décrites en 2011 en Belgique [MAUGARD & BAUBET, 2004 ; DSF, 2006 ; BAUBET, 2007 ; BAUBET & CAROULLE, 2009]. Lors des pullulations, les colonies parthénogénétiques de l'insecte peuvent complètement recouvrir les troncs, leurs sécrétions cireuses formant alors un feutrage blanchâtre (Fig.1a). L'année suivante, des

craquellements et des nécroses peuvent être observées au niveau de l'écorce, les branches basses peuvent se dessécher et, dans certains cas, des mortalités massives d'arbres sont observées. Cette capacité à induire des mortalités massives est assez surprenante dans le cadre des interactions arbres / pucerons et reste inexpliquée pour le moment. A cause de ses dommages, cet insecte est considéré actuellement comme le plus important ravageur des peupleraies dans le Sud de l'Europe.

La gestion des populations de *P. passerinii* pose plusieurs problèmes : les auxiliaires indigènes semblent inefficaces pour juguler l'accroissement brutal des populations. Des moyens de lutte chimique existent mais sont difficiles à utiliser car les colonies se développent préférentiellement en hauteur, sous la base des houppiers, soit à une dizaine de mètres du sol. En outre, les peupleraies étant souvent situées en zone alluviale, les risques de pollution rendent les traitements phytosanitaires délicats à appliquer [MAUGARD & BAUBET, 2004 ; DSF 2006]. Une alternative à ces modes de lutte est la sélection de cultivars résistants. Des études comparant le comportement, les capacités d'installation et les potentialités de multiplication du puceron sur différents cultivars de peuplier ont ainsi confirmé l'existence de mécanismes de résistance efficaces chez certains d'entre eux, autorisant un criblage des cultivars existants selon leur sensibilité [LAPIETRA & ALLEGRO, 1990 ; SADEGHI *et al.* 2007 ; POINTEAU *et al.*, 2011 et 2012]. En complément, il s'est avéré très utile d'analyser en détail les interactions entre le puceron lanigère et son arbre hôte, afin de définir la nature des mécanismes de résistance impliqués et de mieux appréhender les processus conduisant aux dommages observés en peupleraie. Parmi les points à approfondir, le premier était le mode de nutrition de l'insecte, en particulier la nature des tissus végétaux concernés et la stratégie employée pour les exploiter.

La majorité des pucerons se nourrissent de la sève élaborée de leur plante hôte, en la ponctionnant dans le phloème grâce à leurs pièces buccales modifiées en stylets. Ces insectes produisent deux types de salive : une salive gélifiée, créant dans les tissus de l'hôte une gaine dans laquelle les stylets coulissent jusqu'aux tissus nourriciers, et une salive aqueuse, pouvant être injectée dans les tissus de l'hôte et supposée avoir différents impacts sur la plante-hôte [MILES, 1999]. Chez les espèces spécialistes d'un hôte, la longueur des stylets est proportion-

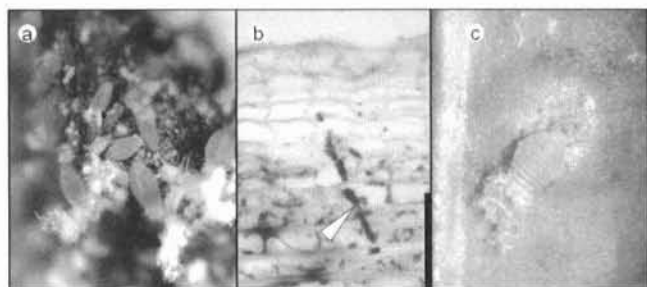


Figure 1. - a : colonie de pucerons lanigères du peuplier (photo : C. Millet). b : gaine salivaire de *P. passerinii* dans le parenchyme cortical de peuplier, la flèche indique la gaine salivaire de nature protéique (coloration à la fuschine acide, échelle : 50 µm) (photo : E. Deprost). c : femelle parthénogénétique aptère sur une bouture de peuplier. L'insecte est positionné sur son site de nutrition qui présente un gonflement caractéristique (photo : V. Lesieur).

* UPRES EA 1207, Laboratoire de Biologie des Ligneux et des Grandes Cultures, Université d'Orléans, Rue de Chartres, BP 6759, 45067 Orléans cedex, France.

** Unité Amélioration, Génétique et Physiologie Forestières, INRA Orléans, Avenue de la Pomme de Pin, BP 20619 Ardon, 45075 Orléans cedex 2, France.

nelle à l'épaisseur des tissus de l'écorce et à la profondeur du phloème [DIXON *et al.*, 1995 ; DIXON, 1997 et 1998]. Les espèces colonisant les racines, les branches ou les troncs des arbres, où le phloème est localisé en profondeur, présentent ainsi des stylets très allongés et des corps de grande taille, comme *Stomaphis quercus* (L.) ou *Lachnus roboris* (L.) sur chêne [DIXON, 1998]. Certaines espèces colonisant les tiges lignifiées ont toutefois adopté une stratégie différente et au lieu de se nourrir aux dépens du phloème, elles consomment des tissus plus superficiels, situés entre le suber et les tissus vasculaires. Un récent travail alliant les techniques histologiques, morphométriques et d'électropénétrographie a permis de démontrer que *P. passerinii* adoptait ce type de stratégie [POINTEAU *et al.*, 2012]. Le puceron, très petit, possède des stylets courts ne lui permettant pas d'atteindre le phloème. Lorsqu'il se nourrit, ses gaines salivaires se localisent dans le parenchyme cortical, plus superficiel, où il procède à des phases d'aspiration soutenues durant plus d'une heure. Pour atteindre son site de nutrition, l'insecte insère ses stylets dans la plante de manière rectiligne, passant indifféremment entre les cellules ou au travers de ces dernières (Fig. 1b). Ce procédé est aussi contraire à celui de la plupart des pucerons qui, pour générer un minimum de réactions de la part de la plante hôte, traversent les tissus jusqu'au phloème en passant entre les cellules, s'orientant par de brèves piqûres intracellulaires [TJALLINGII & HOGEN ESCH, 1993 ; POINTEAU *et al.*, 2012]. Une fois son site de nutrition atteint, *P. passerinii* peut rester à la même place pendant toute la durée de sa vie larvaire et adulte. Ce mode de nutrition original, tant au niveau de la pénétration des tissus que du site de nutrition, suggérerait que la plante hôte présente la mise en place de réactions particulières aux attaques de *P. passerinii* chez sa plante-hôte.

Les espèces se nourrissant, comme *P. passerinii*, dans les tissus superficiels de l'écorce induisent fréquemment des gonflements tumoraux, qualifiés de galls histoïdes ou de pseudogalles. Ces galls constituent des tissus nourriciers où peuvent s'accumuler des nutriments, comme des acides aminés ou de l'amidon, favorisant le développement des insectes [MÜLLICK, 1977 ; SHORTHOUSE & ROHFRTSCH, 1992 ; FORNECK *et al.*, 2002 ; KELLOW *et al.*, 2004]. Lorsque les insectes sont abondants, le développement de ces pseudogalles peut avoir un effet négatif sur le développement des plantes hôtes et entraîner un affaiblissement de la plante par détournement de ses réserves, des déformations de tissus et des pertes de conductivité de sève. Ainsi plusieurs espèces de pucerons induisant des pseudogalles au niveau de l'écorce sont considérées comme des ravageurs : c'est le cas du puceron lanigère du pommier, *Eriosoma lanigerum* (Hausmann), du phylloxéra, *Viteus vitifoliae* (Fitch.), ou encore du puceron lanigère du sapin, *Adelges piceae* (Ratzburg) [BROWN *et al.*, 1991 ; SHORTHOUSE & ROHFRTSCH, 1992 ; FORNECK *et al.*, 2002 ; KELLOW *et al.*, 2004]. Selon les variétés, les plantes-hôtes présentent différents niveaux de résistance à ces ravageurs, qui peuvent se traduire par une incapacité totale ou partielle des insectes à induire des pseudogalles [SANDANAYAKA *et al.*, 2003]. La résistance peut aussi se manifester par l'accumulation de métabolites secondaires toxiques, comme certains composés phénoliques, ou structuraux, comme la lignine ou la subérine, qui entravent le développement des ravageurs et leur exploitation de la plante-hôte [MÜLLICK, 1977 ; BOSTOCK & STERMER 1989 ; SCHOONHOVEN *et al.*, 2005 ; Ockels *et al.*, 2007]. Concernant *P. passerinii*, hormis des gonflements locaux de l'écorce sur les zones infestées de certaines boutures

(Fig. 1c), rien n'indiquait la formation de pseudogalles. Aucune description des impacts locaux de cet insecte sur les tissus corticaux de sa plante hôte n'était disponible et rien n'avait été rapporté non plus concernant d'éventuelles modifications tissulaires ou biochimiques associées aux attaques.

L'objectif général du travail présenté ici était de caractériser, à l'aide de techniques histologiques et histochimiques, les réponses mises en place dans les tissus corticaux de peuplier suite à des piqûres de *P. passerinii*. Après une mise au point de techniques permettant de révéler différentes réactions tissulaires et divers composés (processus de lignification et composés phénoliques solubles), l'évolution anatomique et biochimique des tissus de boutures enracinées de peuplier a été suivie pour des délais d'infestation ou de blessure variables.

MATÉRIELS ET MÉTHODES

MODALITÉS D'INFESTATION ET DE PRÉLÈVEMENT

L'étude a été menée avec une lignée isofemelle de *P. passerinii*, collectée à Reboursin (Indre) et maintenue en élevage sur des boutures du cultivar eura-méricain sensible I-214. Ces insectes ont été utilisés afin d'infester des boutures enracinées de I-214 mises en pot quelques semaines auparavant. Des femelles parthénogénétiques ont été déposées sur la tige lignifiée des boutures, puis retirées une fois qu'elles avaient pondu plusieurs larves. Plusieurs jours après leur installation, pour chaque bouture, une à trois larves isolées ont été choisies et les autres situées à proximité ont été éliminées. La position des larves a été notée et celles-ci ont été laissées en place jusqu'au moment des prélèvements d'échantillons de végétal destinés aux études histologiques. Les boutures infestées ont été maintenues dans des conditions environnementales contrôlées (température : $20 \pm 1^\circ\text{C}$, humidité relative : $70 \pm 5\%$, illumination : $250 \mu\text{E}/\text{cm}^2/\text{s}$).

Deux suivis dans le temps ont été réalisés successivement. Dans le deuxième suivi, en plus des infestations de pucerons et à titre de comparaison, des boutures supplémentaires ont reçu des blessures mécaniques réalisées en plantant dans leur tige des minuties à une profondeur de 0,5 mm, ce qui correspond à la profondeur moyenne des piqûres de *P. passerinii* [POINTEAU *et al.*, 2012]. Ces minuties ont été laissées en place jusqu'au prélèvement des échantillons.

Pour chaque suivi, des prélèvements d'écorce (env. 4 mm²) ou des coupes directes ont été réalisés à 0, 1, 2, 3 et 4 semaines après installation des insectes ou des minuties. Pour le premier suivi, deux boutures abritant chacune trois pucerons, ont été coupées pour chaque temps de cinétique. Pour le deuxième suivi, six boutures avec trois pucerons, et trois boutures avec trois blessures ont été coupées pour chaque temps de cinétique. En parallèle, pour chaque suivi, un prélèvement a été réalisé dans une zone indemne des chaque bouture infestée, pour servir de témoin, et des prélèvements ont été réalisés en fin de cinétique sur des plants témoins n'ayant reçu aucun puceron.

PRÉPARATION DES ÉCHANTILLONS, COUPES, COLORATIONS ET OBSERVATIONS

Lors du premier suivi, les prélèvements récoltés ont été inclus en résine afin d'observer en détail les modifications anatomiques des tissus. La deuxième cinétique a permis de réaliser des coupes fraîches pour observer les processus de lignification et les composés phénoliques solubles.

Les échantillons inclus en résine ont tout d'abord été fixés dans une solution de glutaraldéhyde 2,5 %, puis déshydratés grâce à des bains successifs dans des solutions à teneur croissante en éthanol (25, 50, 70, 95 puis 100 %). Les échantillons ont ensuite été inclus dans de la résine Techno-Vit® (Kulzer). Après inclusion, des coupes transversales fines de 5 µm d'épaisseur ont été réalisées au niveau du site d'installation du puceron, à l'aide d'un microtome (RM2155, Leica) équipé d'un couteau en carbure de tungstène. Les coupes fraîches, transversales et de 40 µm d'épaisseur, ont été réalisées directement à partir de tronçons de boutures, à l'aide d'un microtome à glissière.

Les coupes fines ont été colorées au bleu de méthylène-azur II, selon la méthode de RICHARDSON *et al.* [1960]. Cette technique permet une observation générale des caractéristiques cellulaires des tissus végétaux et colore aussi les gaines salivaires de pucerons. Les coupes fraîches ont été colorées soit par le carmino-vert, qui permet d'observer l'anatomie des tissus et de différencier les parois celluloses des parois lignifiées, soit par la vanilline-O qui met en évidence les tannins condensés, soit par le DMACA pour révéler les tannins condensés et les flavanols.

L'ensemble des coupes a été observé sous microscope photographique (DMR, Leica) couplé à une caméra (DFC 320, Leica). L'ensemble de ces travaux d'histologie a été réalisé grâce à la plateforme d'histologie du centre INRA d'Orléans.

RÉSULTATS

Durant toute la première cinétique, l'étude anatomique de l'écorce des échantillons témoins prélevés sur les plants infestés en dehors des zones de piqûre n'a montré aucune différence par rapport aux échantillons prélevés sur les plants non infestés (Fig. 2a). L'anatomie des échantillons prélevés au niveau des sites de piqûre a montré en revanche, à partir de deux semaines, des modifications nettes au niveau du parenchyme cortical (Fig. 2b et c), qui sont restées superficielles et n'ont

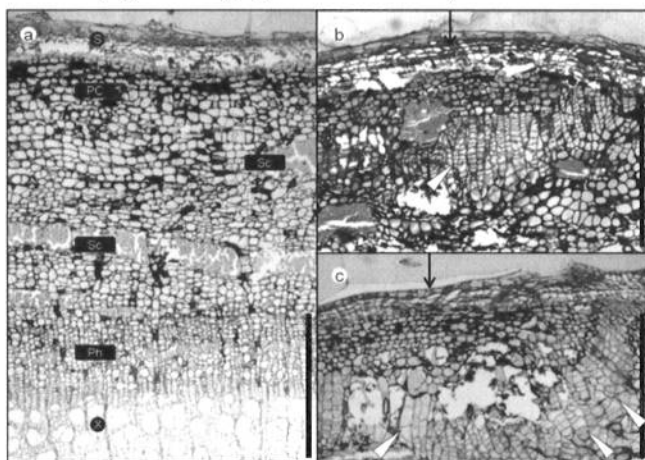


Figure 2. - Coupes transversales (5 µm) d'écorce de peuplier (I-214) incluses en résine Techno-Vit® et colorées au Richardson. a : échantillon témoin, sans blessure ni infestation, montrant l'anatomie des tissus corticaux (S : suber, PC : parenchyme cortical, Sc : sclérenchyme, Ph : phloème, X : xylème). b : zone de réaction à la piqûre de *P. passerinii* au bout de 3 semaines d'infestation. c : zone de réaction à la piqûre de *P. passerinii* au bout d'un mois d'infestation. Les flèches noires indiquent le point de piqûre, les flèches blanches indiquent les zones de multiplication cellulaire et d'apparition de cellules hypertrophiées à paroi mince. Echelle : 500 µm, photos : E. Deprost.

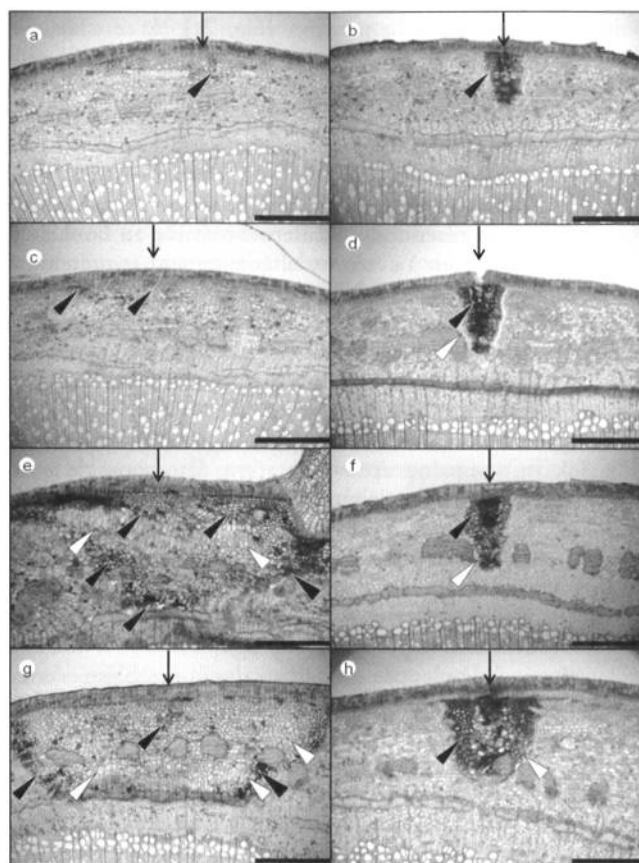


Figure 3. - Coupes transversales (40 µm) d'écorce fraîche de peuplier (I-214), colorées au carmino-vert. Echantillons infestés par *P. passerinii* : a : 1 semaine, c : 2 semaines, e : 3 semaines, g : 1 mois. Echantillons blessés avec une minutie : b : 1 semaine, d : 2 semaines, f : 3 semaines, h : 1 mois. Les flèches noires indiquent le point de piqûre, les flèches blanches indiquent les zones de multiplication cellulaire, les flèches noires bordées de blanc indiquent les zones de lignification. Echelle : 500 µm, photos : F. Dardeau.

jamais affecté le phloème, le cambium ou le xylème durant la période considérée. Au niveau des zones d'infestation des gaines salivaires ont pu être observées. Dans la plupart des cas, une seule gaine, non branchée était visible.

Une semaine après l'infestation, aucune modification anatomique notable n'a été observée. Néanmoins, au bout de deux semaines d'infestation, dans la moitié des échantillons des cellules à parois très minces, de section transversale rectangulaire et d'aspect méristématique sont apparues dans le parenchyme cortical, à proximité de la zone de pénétration des stylets. Pour l'autre moitié, les modifications étaient beaucoup plus importantes puisqu'une zone de multiplication cellulaire, méristématique avait produit un nouveau tissu de cellules alignées, rectangulaires à paroi mince dans le parenchyme cortical (Fig. 2b). Ce nouveau tissu de $0,17 \pm 0,06$ mm d'épaisseur et $0,6 \pm 0,1$ mm de largeur était situé sous le point de pénétration des stylets. Cette zone de réaction commençait à prendre la forme d'un arc de cercle sous le suber, encadrant ainsi les stylets du puceron. Au bout de 21 jours d'infestation, le tissu de cellules nouvellement formé était visible sur l'ensemble des coupes. Ce tissu réactionnel, non présenté ici, s'étendait alors en moyenne sur $0,40 \pm 0,06$ mm d'épaisseur et $1,12 \pm 0,06$ mm de largeur. Au bout d'un mois d'infestation, l'ensemble des échantillons présentait un tissu réactionnel bien développé, avec une forme en demi-lune uniforme autour du

point de pénétration du puceron (Fig. 2c). A ce stade, les dimensions de la zone réactionnelle étaient de $0,35 \pm 0,03$ mm d'épaisseur et $1,3 \pm 0,2$ mm de largeur en moyenne. Les cellules nouvellement formées présentaient des parois minces et une hypertrophie par rapport aux cellules du parenchyme cortical.

Les résultats de la deuxième cinétique ont confirmé l'apparition d'un tissu réactionnel, clairement visible au bout de 3 semaines, continuant à s'étendre ultérieurement et présentant des cellules hypertrophiées (Fig. 3a, c, e, g). La coloration au carmino-vert a montré que des dépôts de lignine étaient observables une semaine après infestation, au niveau des parois des cellules adjacentes au trajet des stylets de pucerons. Ces premières lignifications sont apparues sous le suber (Fig. 3a) et se sont étendues, tout en restant diffuses, la semaine suivante (Fig. 3c). Trois semaines après infestation, deux zones de lignification se distinguaient clairement : la première, sous le suber, correspondait à une extension de la lignification initiale, la seconde, distale, se situait sous la zone de réaction en développement (Fig. 3e). Ces deux zones étaient toujours observables un mois après inoculation et quelques points de lignification étaient visibles dans le phloème (Fig. 3g).

La réaction développée au niveau des zones blessées avec une minutie était clairement différente (Fig. 3b, d, f, h). Dès la première semaine, une lignification très intense était observable au niveau des parois des cellules bordant la blessure (Fig. 3b). Au bout de deux semaines, la lignification était toujours localisée autour de la blessure mais elle était en plus bordée d'un nouveau tissu formé de quelques cellules empilées (Fig. 3d). Les observations réalisées les semaines suivantes n'ont pas montré d'évolution nette de la réaction (Fig. 3f, h), qui s'est avérée au final beaucoup plus localisée que celles induites par les piqûres de puceron (Fig. 3g).

Les colorations à la vanilline-O et au DMACA, visant à mettre en évidence les composés phénoliques solubles, ont indiqué que, avant tout dommage, les composés phénoliques étaient répartis de manière précise au niveau des tissus corticaux. La coloration à la vanilline-O a révélé une concentration des tannins dans les vacuoles des cellules situées principalement au niveau du phelloderme, immédiatement sous le suber, et au niveau des cellules du parenchyme cortical localisées entre les îlots de sclérenchyme (Fig. 4c). Quelques cellules dispersées du parenchyme renfermaient toutefois, elles aussi, des tannins dans leur vacuole. La coloration au DMACA a donné des résultats identiques, bien que moins nets, pour les tannins condensés et les flavanols (Fig. 4e).

Le développement de la zone de réaction suite aux piqûres de *P. passerinii*, en plus des accumulations de lignine au niveau des parois (Fig. 4b), s'est aussi accompagné de modifications pour les phénols solubles normalement situés dans les vacuoles. La coloration à la vanilline-O, ainsi que dans une moindre mesure celle au DMACA, ont indiqué que les composés phénoliques vacuolaires avaient progressivement disparu lors du développement de la zone réactionnelle (Fig. 4d, f). Un mois après l'infestation, ils étaient toujours concentrés dans les vacuoles des cellules phellodermiques, mais avaient pour la plupart disparu des cellules situées entre les îlots de sclérenchyme. En revanche, ils étaient encore bien présents dans les vacuoles des cellules en périphérie de la zone réactionnelle, sur la bordure interne de la zone de lignification distale entourant la zone de réaction. Les colorations au DMACA et à la vanilline-O ont aussi indiqué qu'au bout d'un mois, en bordure de zone de réaction ainsi que dans le

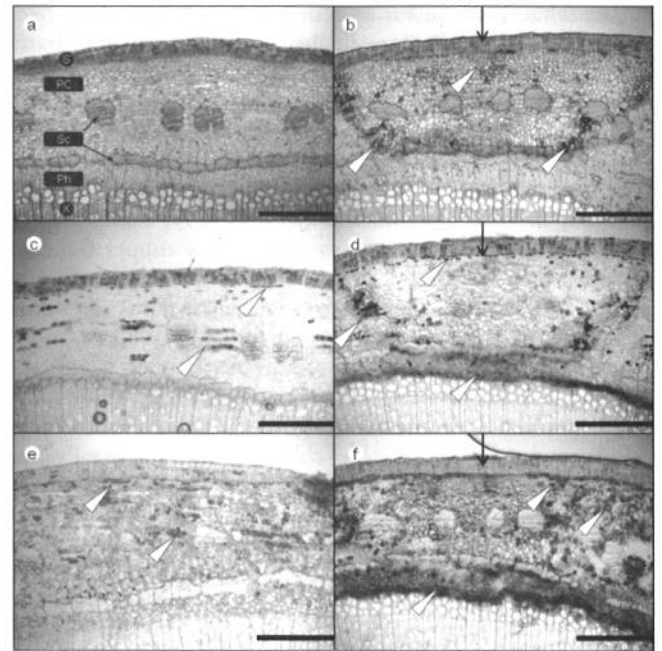


Figure 4. - Coupes transversales (40 μ m) d'écorce fraîche de peuplier (I-214), colorées au carmino-vert (a et b), à la vanilline-O (c et d) et au DMACA (e et f). Echantillons témoins : a, c, e. Echantillons infestés par *P. passerinii* pendant 1 mois : b, d, f. Les flèches noires indiquent le point de piqûre, les flèches blanches indiquent les zones de lignification pour la coupe b et les zones d'accumulation préférentielles de composés phénoliques solubles pour les coupes c, d, e et f, soit dans les vacuoles (ex. c et e) soit dans les espaces intercellulaires ou les parois (. S : suber, PC : parenchyme cortical, Sc : sclérenchyme, Ph : phloème, X : xylème. Echelle : 500 μ m, photos : F. Dardeau.

phloème et dans la zone cambiale, des composés phénoliques s'étaient accumulés dans les parois ou les espaces intercellulaires.

Suite aux blessures par minuties, les colorations à la vanilline-O et au DMACA ont aussi indiqué une accumulation progressive de composés phénoliques de type tannins condensés ou flavanols dans les parois et/ou les espaces intercellulaires dès la première semaine après la blessure. Ces accumulations sont toutefois restées cantonnées dans la zone lignifiée et au niveau des assises cellulaires apparues autour de celle-ci. Des vacuoles renfermant des composés phénoliques solubles étaient toujours visibles dans les zones de réaction lignifiées un mois après les blessures. Les dépôts étaient aussi présents autour de la zone de réaction mais sur une faible épaisseur et ils ne se s'étaient pas étendus aux tissus conducteurs.

DISCUSSION

La localisation des zones d'accumulation de composés phénoliques suggère que ces composés doublent ou complètent les défenses physiques de l'écorce situées au niveau des cellules subérisées du suber et des cellules lignifiées des îlots de sclérenchyme, visibles grâce la coloration au carmino-vert (Fig. 4a, c, e). Ces deux types de défense s'organisent visiblement en deux lignes complémentaires protégeant d'une part le tissu de réserve qu'est le parenchyme cortical, d'autre part les tissus conducteurs et l'assise génératrice cambiale. Les piqûres de *P. passerinii* ainsi que les blessures par minuties, bien que superficielles, ont toutes deux modifié l'organisation des tissus de l'écorce tant en termes anatomiques que biochimiques.

Toutefois, les deux types d'agressions ont induit chez la plante des réactions très différentes du point de vue de leur nature, de leur ampleur et de leur vitesse.

Concernant les zones blessées avec des minuties, une accumulation initiale de lignine a été observée dans les parois des cellules bordant la zone affectée, entourée ensuite par un tissu formé de quelques cellules empilées. Cette séquence correspond typiquement à la succession des événements observés dans l'écorce des arbres, aussi bien chez les Angiospermes que chez les Gymnospermes, suite à une blessure mécanique ou à une infection [MÜLLICK, 1977 ; BIGGS *et al.*, 1984 ; WEILAND & STANOSZ, 2007]. La lignification des parois cellulaires à proximité immédiate des zones lésées est en effet une des premières réponses des tissus de l'écorce suite à une agression, complétée, peu de temps après, par des dépôts de subérine dans les parois, rendant le tissu imperméable aux solutions aqueuses [MULLICK, 1977 ; BIGGS *et al.*, 1984 ; PEARCE, 1996]. La présente étude ne montre pas de dépôt de subérine mais les colorations employées ne le permettaient pas. La lignification des parois, qui crée une barrière physique limitant la progression plus en profondeur des pathogènes [BHUIYAN *et al.*, 2009], est la première étape d'un processus de compartimentation dont le résultat est l'isolement des agresseurs des tissus internes de l'hôte, en particulier des tissus conducteurs. A la suite de cette première étape, on observe généralement la formation d'un périoderme de blessure juste sous la zone d'accumulation de lignine et subérine. Des divisions cellulaires se produisent, suite à une différenciation des cellules du parenchyme en un méristème secondaire, similaire à un phellogène, générant vers l'extérieur un suber réactionnel et, vers l'intérieur, un phelloderme [MULLICK, 1977 ; BIGGS *et al.*, 1984]. Encadrant la zone lignifiée et subérifiée, ce méristème secondaire réactionnel rejoint à ses extrémités le phellogène normal et permet ainsi de restaurer l'organisation initiale et la continuité des tissus externes de l'écorce. Dans notre expérience, un début de restauration de la continuité des tissus externes a été en effet observé, dès la deuxième semaine suivant la blessure. Suite au développement du périoderme de blessure, les cellules lésées lors de l'agression, ainsi que celles qui ont été lignifiées sont par voie de conséquence isolées et désolidarisées des tissus vivants de l'écorce et finissent par être desquamées lors du développement du suber, terminant le processus de compartimentation [SHIGO, 1984]. Cette élimination des tissus lésés n'a pas pu être observée au cours de notre cinétique, celle-ci survenant sur des pas de temps plus longs.

Suite aux piqûres de *P. passerinii*, la réponse des tissus corticaux de peuplier présente plusieurs similitudes avec celle décrite précédemment. Suite à la pénétration intracellulaire des stylets jusque dans le parenchyme cortical, la première modification observée une semaine après l'infestation était une lignification des parois des cellules du parenchyme sous-jacentes au suber et situées à proximité des stylets. La lignification était moins intense que celle observée après blessure mécanique mais plus diffuse, l'intensité plus faible s'expliquant sans doute par l'épaisseur nettement supérieure des minuties comparée à celle du stylet de *P. passerinii*, causant ainsi des dommages initiaux plus importants. Il est aussi possible toutefois que la salive injectée par les pucerons ait partiellement inactivé les réactions de défense de l'hôte. Certaines des enzymes présentes dans la salive aqueuse des pucerons sont en effet supposées minimiser les réponses de défense des plantes-hôtes [MILES, 1999 ; WALLING, 2008]. Cette lignification s'est étendue suite à la piqûre de *P. passerinii*, alors qu'elle est restée localisée suite

à la blessure mécanique, suggérant un impact diffus et étendu des sécrétions salivaires de *P. passerinii* mais pouvant peut-être aussi s'expliquer par une multiplication des piqûres de l'insecte, générant durant toute la cinétique de nouvelles réactions. Cependant, un nombre important de gaines salivaires aurait dû être observé dans ce dernier cas, alors que seulement une à deux gaines étaient visibles par zone de réaction.

Suite à ce phénomène de lignification, des modifications anatomiques ont pu être observées à partir de deux à trois semaines. Comme dans le cas des blessures mécaniques et selon un timing identique, des cellules du parenchyme cortical sous-jacentes à la zone lignifiée se sont différenciées en cellules méristématiques et ont généré, par divisions périclines, un nouveau tissu de cellules alignées. De même, la forme en demi-lune du tissu généré, observable au bout d'un mois d'infestation, évoque la jonction effectuée par le méristème secondaire réactionnel avec le phellogène afin de restaurer la continuité des tissus externes de l'écorce. Cependant, contrairement au cas des blessures mécaniques, cette zone réactionnelle s'est étendue et épaissie par la suite. De nombreuses cellules ont ainsi été générées, d'une taille supérieure à celles des cellules initiales du parenchyme. Les parois de ces cellules étaient aussi plutôt minces, à l'inverse de ce qui est normalement produit par un périoderme de blessure. Cette zone est restée superficielle et n'a jamais perturbé l'organisation du phloème et de la zone cambiale. Une autre particularité des zones de réaction induites par les piqûres était la formation d'une zone de lignification supplémentaire après trois semaines d'infestation, située sous les cellules nouvellement formées. L'origine de cette lignification supplémentaire n'est pas claire. Une compression des cellules du parenchyme due à la croissance de la zone de réaction pourrait l'expliquer, de même qu'un impact des sécrétions salivaires de l'insecte.

Outre des processus de lignification des parois, d'autres modifications biochimiques ont pu être observées au niveau des zones de réaction, en particulier une disparition des composés phénoliques vacuolaires des cellules parenchymateuses de cette zone, ceux des vacuoles de phelloderme restant en revanche en place. Cela pourrait s'expliquer par le déversement de ces composés dans les espaces intercellulaires. Leur accumulation dans ces espaces et/ou dans les parois est en effet visible mais seulement autour de la zone de réaction et dans les tissus du phloème et du cambium sous-jacents, et non au niveau des tissus en développement. La disparition des composés phénoliques des vacuoles pourrait aussi s'expliquer par leur utilisation comme précurseurs de la lignine s'accumulant sous le suber ou autour de la zone réactionnelle. Enfin une dernière hypothèse serait que les enzymes salivaires de *P. passerinii* les aient dégradés. La salive de certains pucerons peut en effet contenir des polyphénoloxydases et des peroxydases pouvant dégrader les composés phénoliques [URBANSKA *et al.*, 1998 ; CHERQUI & TJALLINGII, 2000]. Néanmoins le rôle de ces enzymes dans la plante n'a pour le moment pas été éclairci et la salive de *P. passerinii* n'a fait l'objet d'aucune étude, il n'est donc pas certain qu'elle renferme ce type d'enzymes.

Bien que la réaction générée par les piqûres de *P. passerinii* présente des similitudes avec un périoderme de blessure généré de manière aspécifique par une gamme très large d'agressions, plusieurs éléments indiquent qu'elle est très spécifique du couple *P. passerinii* / *Populus* sp. La formation d'un tissu réactionnel très étendu, avec production d'un nombre important de cellules hypertrophiées à paroi mince, et sans accumulation de métabolites secondaires toxiques sur le site précis de nutri-

tion, suggère que l'insecte serait capable de modifier la réponse de l'arbre. Il est envisageable que la piqûre de *P. passerinii* entraîne la formation d'un périoderme de blessure qu'il modifie de telle sorte que les cellules du suber réactionnel soient hypertrophiées et possèdent des parois minces. Les études réalisées sur des pucerons colonisant des végétaux ligneux et pour lesquels le comportement alimentaire est proche de celui de *P. passerinii* indiquent que ces insectes induisent fréquemment des déformations tumorales se traduisant notamment par une hypertrophie des cellules du parenchyme situées au niveau du site d'alimentation du puceron. Il semblerait que des composés salivaires sécrétés par les pucerons puissent être à l'origine de la formation de ces galles, bénéfiques pour les pucerons puisque les cellules tumorales accumulent notamment des acides aminés et de l'amidon [POLLARD, 1973 ; BLACKMAN & EASTOP, 1994 ; FORNECK *et al.*, 2002 ; KELLOW *et al.*, 2004]. Chez *Abies balsamea*, une étude portant sur *Adelges piceae* a mis en évidence la formation d'un périoderme de blessure, suite à une croissance anormale des tissus de l'écorce par hypertrophie des cellules situées autour du point de pénétration des stylets [MÜLLICK, 1977]. Il n'est pas impossible que les interactions entre *P. passerinii* et son arbre hôte soient du même type et aboutissent à la formation d'un tissu hypertrophié, un périoderme de blessure modifié, plus nutritif que les tissus originels, et sur lequel l'insecte devrait montrer des performances supérieures. Le fait que l'insecte reste sur son hôte, même après l'apparition de la zone réactionnelle, indique qu'il est vraisemblablement peu affecté par la mise en place du tissu réactionnel. Une étude comparative des performances des insectes sur des tissus normaux et des tissus modifiés permettrait plus précisément d'estimer l'impact de la réponse de l'arbre sur les performances du puceron. De même, une étude comparative similaire visant à doser les composés nutritifs (amidon, acides aminés) permettrait de savoir si la qualité nutritionnelle des tissus végétaux est modifiée au niveau des zones de réaction.

Même s'il convient d'être prudent pour transposer ces résultats obtenus sur boutures en conditions de laboratoire à des arbres en conditions naturelles, les réactions décrites peuvent expliquer une partie des symptômes observés. Ainsi, les gonflements notés sur les boutures infestées pourraient résulter de la formation du tissu à cellules hypertrophiées. Les craquelures au niveau de l'écorce pourraient résulter de la lignification en surface, détruisant localement le phelloderme, remplacé en profondeur par un périoderme de blessure. Rendu discontinu suite aux pullulations de colonies, ce phelloderme générerait ainsi l'année suivante une écorce elle aussi discontinue. Ces impacts possibles restent toutefois assez limités et ne peuvent pas expliquer les mortalités d'arbres observées. Bien que les coupes fraîches indiquent que le développement des zones de réaction puisse avoir des répercussions sur le phloème et le cambium des zones infestées et par conséquent potentiellement sur la conduction de sève dans les boutures, il est peu probable que ce processus affecte des arbres plus âgés pour lesquels le phloème est plus profond et surtout bien plus épais. En revanche il est possible qu'un fort recouvrement du tronc par les colonies, générant des zones de réaction sur l'ensemble de l'écorce, amène l'arbre à une forte dépense énergétique pouvant avoir des répercussions physiologiques jusqu'à l'année suivante, compromettant le débourrement et la résistance à des parasites secondaires. Une étude des réserves énergétiques d'arbres infestés et témoins permettrait d'étayer cette hypothèse.

Remerciements. - Ce travail a été réalisé grâce au soutien financier du Conseil Général du Loiret. Nous remercions Sophie Pointeau pour ses conseils en matière de préparation d'échantillons et de coloration et Thomas Auffray pour son aide technique.

Références bibliographiques

- BAUBET O., 2007. - *Le puceron lanigère étend son aire de répartition. Bilan de la santé des forêts en 2006*. Ministère de l'Agriculture et de la Pêche, Paris, 2p.
- BAUBET O. & CAROUILLE F., 2009. - *Peupleraie française : entre rouilles et puceron lanigère, l'inquiétude demeure. Bilan de la santé des forêts en 2008*. Ministère de l'Agriculture et de la Pêche, Paris, 7p.
- BHUIYAN N.H., SELVARAJ V., WEI Y. & KING J., 2009. - Gene expression profiling and silencing reveal that monolignol biosynthesis plays a critical role in penetration defense in wheat against powdery mildew invasion. *Journal of Experimental Botany*, **60** : 509-521.
- BIGGS A.R., MERRILL W. & DAVIS D.D., 1984. - Discussion: Response of bark tissues to injury an infection. *Canadian Journal of Forest Research*, **14** : 351-356.
- BLACKMAN R.L. & EASTOP V.F., 1994. - *Aphids on the world's trees: an identification and information guide*. CABI publishing, Wallingford, 904 p.
- BOSTOCK R.M. & STERMER B.A. 1989. - Perspectives on Wound Healing in Resistance to Pathogens. *Annual Review of Phytopathology*, **27** : 343-371.
- BROWN M.W., GLENN D.M. & WISNIEWSKI M.E., 1991. - Functional and anatomical disruption of apple roots by the woolly apple aphid (Homoptera: Aphididae). *Journal of Economic Entomology*, **84** : 1823-1826.
- CHERQUI A. & TJALLINGH W.F., 2000. - Salivary proteins of aphids, a pilot study on identification, separation and immunolocalisation. *Journal of Insect Physiology*, **46** : 1177-1186.
- DIXON A.F.G., KINDLMANN P. & JAROSIK V., 1995. - Body size distribution in aphids: relative surface area of specific plant structures. *Ecological Entomology*, **20** : 111-117.
- DIXON A.F.G., 1997. - *Adaptations of phytophagous insects to life on trees, with particular reference to aphids*. In Watts A.D., Stork N.E., Hunter M.D. eds. *Forests and Insects*. Chapman & Hall, London. pp. 1-14.
- DIXON A.F.G., 1998. - *Aphid Ecology : An Optimization Approach*. Chapman & Hall, London. 312 p.
- DSF, 2006. - *Puceron lanigère du peuplier. Information Santé des Forêts*. Ministère de l'Agriculture et de la Pêche, Paris. 2 p.
- FORNECK A., KLEINMANN S., BLAICH R. & ANVARI S.F., 2002. - Histochemistry and anatomy of phylloxera (*Daktulosphaira vitifoliae*) nodosities on young roots of grapevine (*Vitis* spp). *Vitis*, **41** : 93-97.
- KELLOW A.V., SEDGLEY M. & VAN HEESWIJCK R., 2004. - Interaction between *Vitis vinifera* and Grape Phylloxera : changes in root tissue during nodosity formation. *Annals of Botany*, **93** : 581-590.
- LAPIETRA G. & ALLEGRO G., 1990. - Suscettibilità a *Phloeomyzus passerinii* Sign. dei cloni di pioppo coltivati in Italia. *Informatore Fitopatologico*, **40** : 41-44.
- MAUGARD F. & BAUBET O., 2004. - *Le puceron lanigère du peuplier accentue sa présence dans le Sud-Ouest et étend sa zone d'épidémie vers le Nord. Bilan de la santé des forêts en 2003*. Ministère de l'Agriculture et de la Pêche, Paris, 4p.
- MILES P.W., 1999. - Aphid saliva. *Biological Reviews*, **74** : 41-85.
- MÜLLICK D.B., 1977. - The non-specific nature of defense in bark and wood during wounding, insect and pathogen attack. *Recent advances in Phytochemistry*, **11** : 395-441.

- OCKELS F.S., EYLES A., MCPHERSON B.A., WOOD D.L. & BONELLO P., 2007. - Phenolic chemistry of coast live oak response to *Phytophthora ramorum* infection. *Journal of Chemical Ecology*, **33** : 1721-1732.
- PEARCE R.B., 1996. - Antimicrobial defences in the wood of living trees. *New Phytologist*, **132** : 203-233.
- POINTEAU S., SALLÉ A., LESIEUR V., BANKHEAD-DRONNET S., BONNAFFOUX M. & LIEUTIER F., 2011. - Estimating the effect of poplar resistance on the performance of the woolly poplar aphid, *Phloeomyzus passerinii*, in various experimental conditions. *Canadian Journal of Forest Research*, **41** : 1233-1241.
- POINTEAU S., AMELINE A., LAURANS F., SALLÉ A., RAHBÉ Y., BANKHEAD-DRONNET S. & LIEUTIER F., 2012. - Exceptional plant penetration and feeding from cortical parenchyma cells by the woolly poplar aphid. *Journal of Insect Physiology*, **58** : 857-866.
- POLLARD D.G., 1973. - Plant penetration by feeding aphids (Hemiptera, Aphidoidea) : a review. *Bulletin of Entomological Research*, **62** : 631-714.
- RICHARDSON K.C., JARETT L. & FINKE E.M., 1960. - Embedding in epoxy resins for ultrathin sectioning in electron microscopy. *Stain Technology*, **35** : 313-323.
- SADEGHI S.E., RAJABI-MAZHAR N.A. & MOHARRAMPOUR S., 2007. - A study on the incidence of woolly poplar aphid, *Phloeomyzus passerinii* (Homoptera, Aphididae) on poplar species and clones in Hamedan province, Iran. *Journal of Entomological Society of Iran*, **26** : 47-59.
- SANDANAYAKA W.R.M., BUS V.G.M., CONNOLLY P. & NEWCOMB R., 2003. - Characteristics associated with the Woolly Apple Aphid, *Eriosoma lanigerum*, resistance of three apple rootstocks. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, **109** : 63-72.
- SCHOONHOVEN L.M., VAN LOON J.J.A. & DICKE M., 2005. - *Insect-plant Biology*. Oxford university Press, New York. 421 p.
- SHIGO A.L., 1984. - Compartmentalization: a conceptual framework for understanding how trees grow and defend themselves. *Annual Review of Phytopathology*, **22** : 189-214.
- SHORTHOUSE J.D. & ROHFRTSCH O., 1992. - *Biology of Insect-Induced Galls*. Oxford University Press, New York. 296 p.
- TJALLINGII W.F. & HOGEN ESCH T.H., 1993. - Fine structure of aphid stylet routes in plant tissues in correlation with EPG signals. *Physiological Entomology*, **18** : 317-328.
- URBANSKA A., TJALLINGII, W.F., DIXON, A.F.G. & LESZCZYNSKI B., 1998. - Phenol oxidizing enzymes in the grain aphid's saliva. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, **86** : 197-203.
- WEILAND J.E. & STANOSZ G.R., 2007. - The histology of hybrid poplar clones inoculated with *Septoria musiva*. *Plant Disease*, **91** : 1524-1530.
- WALLING L., 2008. - Avoiding effective defenses: strategies employed by phloem-feeding insects. *Plant physiology*, **146** : 859-866.