



THESIS / THÈSE

MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES

Production, purification et caractérisation de l'endopolygalacturonase de *Colletotrichum lindemuthianum*

BAES, Peter

Award date:
1989

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

1989



FACULTÉS UNIVERSITAIRES N.D. DE LA PAIX
NAMUR
FACULTÉ DES SCIENCES

Production, purification et
caractérisation de
l'endopolygalacturonase de
Colletotrichum lindemuthianum.

Mémoire présenté pour l'obtention du grade
de Licencié en Sciences
biologiques
par

Peter BAES

Production, Purification et Caractérisation de l'endopolygalacturonase de *Colletotrichum lindemuthianum* (β)

BAES Peter

Résumé

Colletotrichum lindemuthianum est une moisissure responsable de l'antracnose chez le haricot. On attribue à l'endopolygalacturonase (endoPG) sécrétée par le champignon un rôle déterminant dans la pathogenèse. L'endoPG hydrolyse en effet l'acide polygalacturonique, une composante architecturale importante de la paroi végétale. Dans ce mémoire sont proposés un protocole de production de l'endoPG par fermentation d'un milieu liquide en présence du champignon et un protocole de purification de l'endoPG. L'enzyme purifiée a été caractérisée. Elle est instable et se conserve mal à 4°C. L'endoPG est une protéine faiblement glycosylée de 37.000 daltons ayant un p*H*_i de 6,5 et qui présente un optimum thermique à 50°C et un p*H* optimum compris entre 5 et 5,5. L'enzyme est incapable d'hydrolyser un gel pectate-calcium. En outre, il a été démontré, à l'aide d'un sérum anti-endoPG, que la race β de *C. lindemuthianum*, non virulente sur le haricot var. Roi des Beurres et la race bwambara, virulente, possèdent la même endoPG. Ceci prouve que l'endoPG ne peut expliquer, à elle seule, la virulence du champignon sur le haricot.

Remerciements

Ce mémoire n'a pu être réalisé qu'avec le concours d'un certain nombre de personnes auxquelles j'exprime ma reconnaissance.

Avant tout, je tiens à remercier le Professeur P. Van Cutsem, promoteur de ce mémoire, qui m'a accueilli dans son laboratoire et qui m'a guidé tout au long du travail.

J'exprime également ma reconnaissance à Françoise Liners, Pascale Hubert, Albert Charlier et Johan Messiaen pour leur aide efficace et dévouée.

Avant-propos : but du travail et logique poursuivie

Le travail présenté ici porte essentiellement sur une enzyme de *Colletotrichum lindemuthianum* – une moisissure –, agent causal de l'antracnose chez le Haricot. Il s'agit d'une endopolygalacturonase (endoPG). C'est une enzyme exocellulaire sécrétée par *C. lindemuthianum* qui joue un rôle important lors de l'infection du Haricot par le champignon. L'endoPG est en effet capable d'hydrolyser spécifiquement certains polysaccharides de la paroi végétale.

Le but initial de mon mémoire était de mettre au point une méthode simple de purification de l'endoPG : réaliser une colonne de chromatographie d'affinité. Ceci s'inscrivant dans un programme plus large où l'on vise à plus ou moins long terme à utiliser des enzymes dégradant spécifiquement certains motifs polysaccharidiques de la paroi végétale pour en étudier sa composition et sa structure moléculaire complexe. La purification de l'endoPG de *C. lindemuthianum* s'étant avérée satisfaisante, nous avons caractérisé l'enzyme et produit un sérum anti-endoPG, lequel pouvait dès lors servir à une étude immunocytochimique de l'infection du Haricot par *C. lindemuthianum*.

Parce que l'endoPG est une pectinase, une enzyme qui dégrade la pectine, on trouvera dans l'introduction un résumé de la littérature sur ce groupe d'enzymes et d'abord sur leur substrat, les substances pectiques. Une synthèse des données connues jusqu'à ce jour sur les interactions entre le haricot et son pathogène lors de l'infection est également proposée.

Table des matières

Avant-propos : but du travail et logique poursuivie	1
Table des matières	2
I. Introduction	4
I.1. Les substances pectiques	4
I.1.1. Structure des substances pectiques dans la paroi végétale	5
I.1.2. Propriétés et structure des gels pectate-calcium	5
I.2. Les enzymes pectolytiques	6
I.2.1. Les enzymes dégradant les substances pectiques neutres	7
I.2.2. Les enzymes dégradant le squelette acide	7
I.2.3. L'endopolygalacturonase de <i>Colletotrichum lindemuthianum</i>	9
I.3. Physiologie de l'infection de <i>Phaseolus vulgaris</i> par <i>Colletotrichum lindemuthianum</i>	10
I.3.1. Cytologie de l'infection	10
I.3.2. Interactions hôte-pathogène compatibles et incompatibles	11
I.4. Polygalacturonases et pathogenèse	13
I.4.1. Le rôle des enzymes pectolytiques dans la pathogenèse chez les plantes	13
I.4.2. Le rôle des polygalacturonases de <i>C. lindemuthianum</i> lors de la formation des lésions chez le haricot	14
II. Production de polygalacturonases de <i>Colletotrichum lindemuthianum</i> (β) par fermentation en milieu liquide	15
II.1. Résumé	15
II.2. Matériel et méthode	15
II.2.1. Culture de <i>Colletotrichum lindemuthianum</i>	15
II.2.2. Mesure du poids sec du champignon après fermentation	16
II.2.3. Mesure du pH	17
II.2.4. Dosage des acides uroniques	17
II.2.5. Dosage des sucres réducteurs	18
II.2.6. Dosage de l'activité polygalacturonase	19
II.2.7. Chromatographie sur couche mince	19
II.3. Résultats et commentaires	20
II.3.1. Influence de la source de carbone sur la production d'enzymes à activité polygalacturonase	20
II.3.2. Variations de quelques paramètres physiques et biochimiques et évolution de l'activité polygalacturonase au cours d'une fermentation	20

III. Purification de l'endopolygalacturonase	22
III.1. Résumé	22
III.2. Matériel et méthode	22
III.2.1. Dosage des protéines	22
III.2.2. Protocole de purification	23
III.2.3. Electrophorèse sur gel de polyacrylamide	24
III.2.4. Mise en évidence des activité exo- et endo-polygalacturonase via chromatographie sur couche mince	27
III.3. Evaluation de la purification	28
III.4. Commentaire sur le protocole de purification	28
IV. Caractérisation de l'endopolygalacturonase de <i>Colletotrichum</i> <i>lindemuthianum</i> (β)	30
IV.1. Résumé	30
IV.2. Stabilité de l'enzyme à 4°C	30
IV.3. Recherche de la température optimale d'activité	31
IV.4. Recherche du pH optimum d'activité	32
IV.5. Cinétique enzymatique : recherche du Km	34
IV.6. Recherche du poids moléculaire	36
IV.7. Mise en évidence du caractère glycosylé de l'endoPG	37
IV.8. Recherche du point isoélectrique	39
IV.9. Activité enzymatique sur gel pectate-calcium	39
V. Production d'un sérum anti-endopolygalacturonase de <i>Colletotrichum</i> <i>lindemuthianum</i>	43
V.1. Résumé	43
V.2. Matériel et méthode	43
V.2.1. Préparation des antigènes	43
V.2.2. Immunisation des lapins	44
V.2.3. Dot-blot sur nitrocellulose	44
V.2.4. Test ELISA (méthode indirecte)	45
V.3. Résultats	46
V.4. Discussion	47
V.5. Perspectives	47
VI. Conclusions	50
Annexe : quelques photos de l'infection de <i>Phaseolus vulgaris</i> par <i>Colletotrichum lindemuthianum</i>	51
Références bibliographiques	55

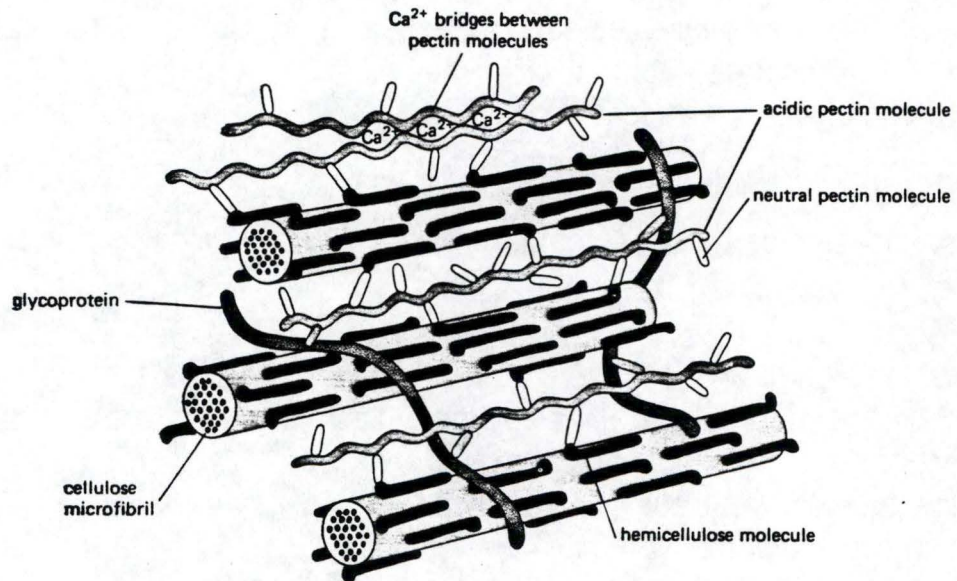


fig. 1.1. : [24] Représentation schématique simplifiée de la paroi primaire montrant comment les 2 composantes majeures, les microfibrilles de cellulose et la matrice de pectine et d'hémicellulose peuvent être imbriquées l'une dans l'autre. Les molécules d'hémicellulose sont liées à la surface des microfibrilles de cellulose par ponts hydrogènes. Certaines de ces molécules d'hémicellulose se lient avec des molécules pectiques acides via des petites molécules pectiques neutres. Des glycoprotéines renforcent encore l'intégrité de la paroi.

I. Introduction

I.1. Les substances pectiques [1,2,3]

Le terme de substances pectiques désigne un ensemble de polysides étroitement associés, caractéristiques de la paroi primaire et de la lamelle mitoyenne des végétaux. La paroi des cellules végétales est une structure complexe semi-rigide, entourant la membrane cytoplasmique et constituée d'un réseau fibrillaire de cellulose noyé dans une matrice amorphe de pectines et d'hémicellulose. (fig. 1.1) Elle assure la croissance par élongation, la morphologie des organes et protège la cellule de la déshydratation, des chocs osmotiques et des infections virales, bactériennes ou fongiques.

La lamelle mitoyenne est la zone intercellulaire qui assure la cohésion du tissu végétal; elle est constituée essentiellement de substances pectiques.

Les parois primaires sont typiques des cellules jeunes en croissance ou indifférenciées. Cette paroi est constituée de 90% de polysides, dont plus d'un tiers sont des substances pectiques et de 10% de protéines. Dans certains cas encore, comme le mésocarpe des fruits ou les cellules cultivées en suspension, on ne rencontre que des parois primaires.

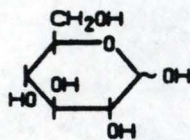
Les substances pectiques offrent des applications technologiques intéressantes. Les pectines sont utilisées comme additifs alimentaires pour leurs propriétés épaississantes et gélifiantes. Ces polysaccharides permettent de contrôler la texture de nombreuses préparations (les confitures par exemple) sans en modifier le goût. Les pectines présentent aussi un intérêt médical. Les pectines HM (Hautement Méthylées), antihémorragiques et cicatrisantes, antidiarrhéiques, antivomitives et détoxifiantes, sont utilisées dans des traitements de gastrites et d'ulcères. Elles contribuent également à la réduction du taux de cholestérol dans le sang et de lipides dans le foie. Quant aux pectines LM (Faiblement Méthylées), qui ont la propriété de complexer fortement la plupart des cations multivalents et plus particulièrement certains métaux lourds, elles facilitent l'élimination de plusieurs de ceux-ci dont le plomb et le strontium.

Les substances pectiques sont des polysaccharides hétérogènes; elles sont constituées de plusieurs composantes polysaccharidiques. Aussi, avant d'aborder leur structure dans la paroi végétale, faut-il avoir quelques notions de leurs différentes composantes.

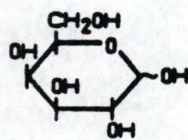
Les substances pectiques ont des domaines acides et des domaines neutres.

Oses à 6 atomes de carbone

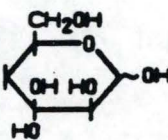
HEXOSES



D-glucose=D-Glcp⁽¹⁾

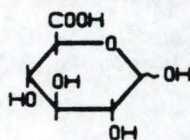


D-galactose=D-Galp

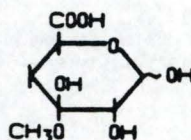


D-mannose=D-Manp

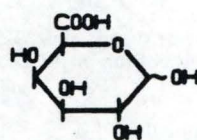
ACIDES URONIQUES



Acide D-glucuronique
= D-GlcpA⁽¹⁾

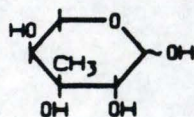


Acide 4-O-méthyle-
D-glucuronique
=(4-Me)-D-GlcpA

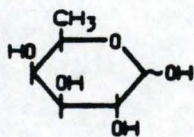


Acide D-galacturonique
= D-GalpA

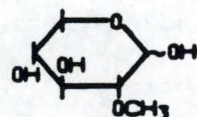
METHYLE PENTOSES



L-rhamnose = L-Rhap

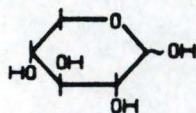


D-fucose = D-Fucp

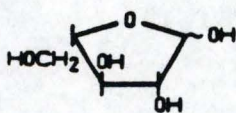


2-O-méthyle-D-xylose =
(2-Me)-D-Xylp

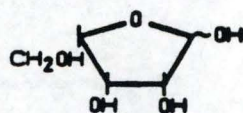
Oses à 5 atomes de carbone



D-xylose=D-Xylp



L-arabinose=L-Araf⁽¹⁾



D-apiose=D-Apif

(1) D-Glcp=D-glucopyranose, D-GlcpA=Acide D-glucopyranosyluronique,
L-Araf=L-arabinofuranose

fig. 1.2. : Oses constitutifs des polysides pectiques

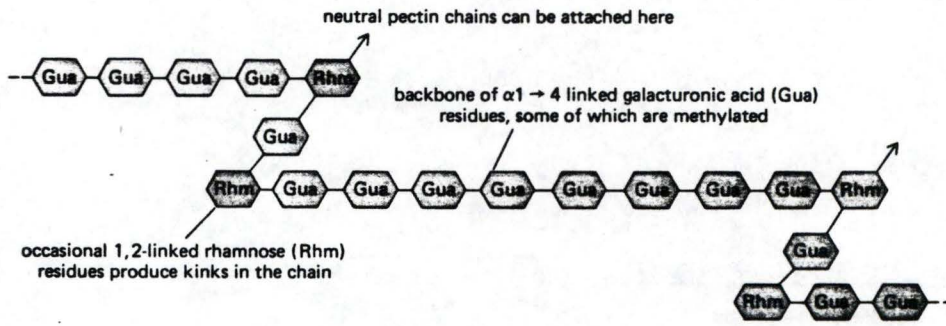
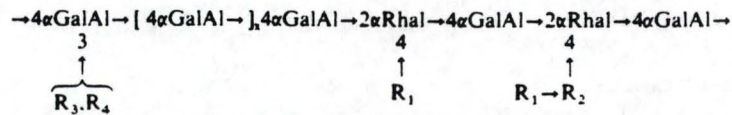


fig. 1.3. : [24] Structure d'un rhamnogalacturonane

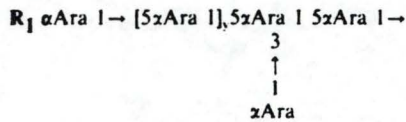
Main chain



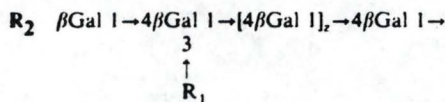
Rhamnose may be dispersed or alternating with galacturonic acid in branched blocks.

A variable proportion of the galacturonic acid residues carry $-\text{CO}_2\text{Me}$ and, in some pectins, $-\text{OAc}$ groups.

Major side-chains



The proportion of branch points varies greatly.



$R_3 \beta\text{Xyl}1 \rightarrow$: may have galactose or fucose attached to 0-2

$R_4 \text{Api}1 \rightarrow 3\text{Api}1 \rightarrow$

R_3 and R_4 are major side-chains of certain unusual pectins.

fig. 1.4. : [4] Chaînes majeures des polysaccharides pectiques

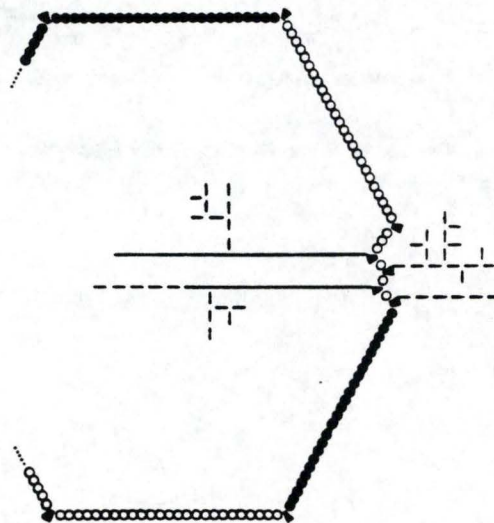


Figure 2. Block structure of pectins. (○) Methyl-esterified galacturonan block; (●) non-esterified galacturonan block; (■) rhamnose; (—) galactan side-chain; (---) arabinan side-chain.

fig. 1.5. : [4] Organisation en bloc des pectines

Les domaines acides sont composés de chaînes pectiques acides qui contiennent de nombreux résidus acide uronique –essentiellement des résidus acide galacturonique– . Les acides polygalacturoniques ou galacturonanes sont formés uniquement d'acide galacturonique (fig. 1.2.). Les acides pectiques contiennent en plus une proportion plus ou moins grande d'oses neutres –les rhamnogalacturonanes par exemple (fig. 1.3.) – ; leurs sels sont les pectates. Les acides pectiniques sont des acides pectiques dont certaines fonctions carboxyliques sont estérifiées par du méthanol.

Les domaines neutres sont composés essentiellement d'arabinanes (polymères de l'arabinose), de galactanes (polymères du galactose), de xylanes (polymères du xylose), de fucanes (polymères du fucose) et d'apianes (polymères de l'apiose).

1.1.1. Structure des substances pectiques dans la paroi végétale [4]

Dans la paroi végétale, les substances pectiques apparaissent très hydratées et très ramifiées.

Le squelette principal des substances pectiques est constitué par des enchaînements $\alpha(1-4)$ de résidus acide galacturonique pouvant être estérifiés – généralement méthylestérifiés– interrompus par des résidus rhamnosyls qui introduisent des coudes par leur insertion $\alpha(1-2)$: il s'agit d'un rhamnogalacturonane.

Les chaînes latérales majeures qui se greffent sur ce squelette principal sont des arabinanes, des galactanes, des arabinogalactanes qui se lient sur le carbone 4 des résidus rhamnosyls, des xylanes et apianes qui se lient sur le carbone 3 de certains résidus acide galacturonique. (fig. 1.4.)

En fait, les pectines sont organisées en différents blocs rhamnogalacturonanes. Des blocs hautement méthylestérifiés alternent avec des blocs linéaires non ramifiés de degrés d'estérification variables. (fig. 1.5.) Les blocs linéaires, non ramifiés et non estérifiés – c-à-d. les galacturonanes ou acides polygalacturoniques – peuvent s'agréger grâce à des liaisons avec le calcium pour former des zones de jonction qui maintiennent la structure d'un gel –la matrice amorphe des parois végétales – . (fig. 1.6.)

1.1.2. Propriétés et structures des gels pectate-calcium [5]

Depuis longtemps déjà, on avait remarqué que lorsqu'on ajoute des ions Ca^{2+} à une solution de pectine, ces molécules s'associent pour former un gel semi-

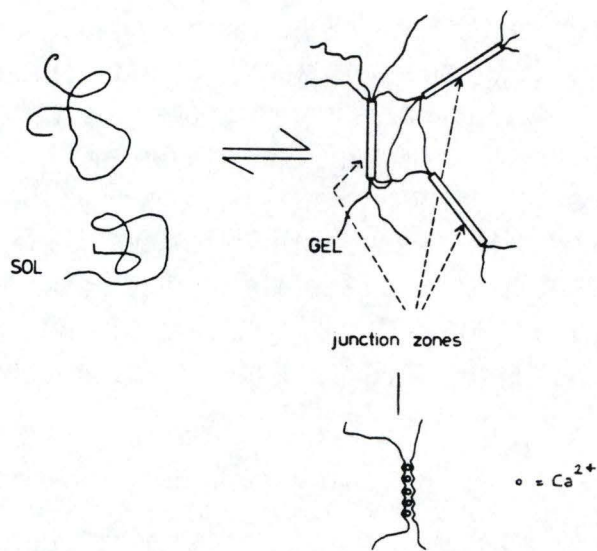


fig. 1.6. : [25] Modèle montrant comment des zones de jonction maintiennent la structure d'un gel.

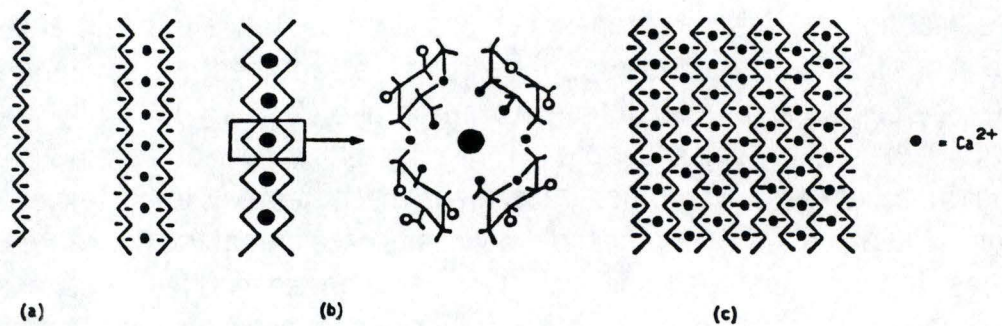


fig. 1.7. : Représentation schématique du modèle en "egg-box" proposé par Rees et ses collaborateurs.
 (a) une chaîne homopolygalacturonique chargée négativement s'associe de façon coopérative avec une deuxième via des ions Ca^{2+} .
 (b) unité répétitive de la boîte à oeufs : détail.
 (c) agrégation en feuillet des dimères en présence d'un excès de calcium.

rigide. Pourtant, ce n'est qu'au début des années '70 que l'on a commencé à s'intéresser à ces gels.

Rees et ses collaborateurs (1982) ont proposé un modèle en deux étapes de l'association coopérative entre chaînes d'acide homopolygalacturonique via des ions calcium. Une dimérisation initiale de chaînes pectiques de symétrie hélicoïdale 2_1 se réalise par liaison coopérative du calcium sur les faces internes de ces chaînes. L'association est coopérative parce que la liaison du premier cation entre une paire de chaînes provoque un alignement qui facilite la liaison des cations suivants, et ainsi de suite le long des deux chaînes. Cette forme d'association a été appelée "egg-box". Un excès de calcium peut induire l'agrégation de ces dimères préformés en tétramères, hexamères, ..., mais l'énergie de liaison de ces associations ultérieures est plus faible que celle libérée lors de la formation de dimères. (fig. 1.7.)

On a montré que les liaisons calcium avec des oligomères homopolygalacturonates ne sont stables qu'au-delà d'une longueur minimale critique des oligomères; ceci traduit l'engagement coopératif des chaînes impliquées dans l'association. On a montré en outre que l'association en boîte à oeufs (egg-box) n'est vraiment stable qu'à partir d'un degré de polymérisation de 14.

1.2. Les enzymes pectolytiques [1,2]

Ces enzymes jouent un rôle fondamental dans les modifications des substances pectiques, entre autres pendant la maturation des fruits. Elles sont aussi libérées par toute une série de pathogènes pour attaquer la paroi végétale.

En raison de leur spécificité, les enzymes pectolytiques sont des outils précieux dans l'analyse structurale des substances pectiques. De la même façon que les enzymes de restriction en génétique moléculaire permettent de couper du DNA en des séquences bien définies et de faire des cartes génétiques de restriction, on pourrait utiliser les enzymes pectolytiques pour mieux comprendre la structure des substances pectiques.

Les enzymes pectolytiques sont également utilisées dans l'industrie alimentaire; surtout pour la clarification des jus de fruits par hydrolyse des pectines.

	Pectinestérase	Exopolygalacturonase	Endopolygalacturonase	Exopectatélyase	Endopectatélyase	Endopectinlyase
numero	E.C. 3.2.1.11	E.C. 3.2.1.67	E.C. 3.2.1.15	E.C. 4.2.2.9	E.C. 4.2.2.2	E.C. 4.2.2.10
origine	fruits moisissures bactéries levures	fruits moisissures bactéries insectes	fruits moisissures bactéries	bactéries	moisissures bactéries	moisissures
réaction	saponification extrémité réductrice COOH libre	hydrolyse extrémité réductrice	hydrolyse hasard	β -élimination extrémité réductrice	β -élimination hasard	β -élimination hasard
substrat préférentiel	pectines	pectates	pectates	pectates	pectates	pectines
pH optimum	4-5 moisissures 7-8 végétaux	4-5	4-5	8-8,5	8-8,9	5-6
T° optimum	55-80°C	40-60°C	40-50°C	35°C	45-50°C	-
% de liaisons rompues	<100	<100	<60	<50	<25-30	<20-45
produits de la réaction	pectate + méthanol	acide galacturonique	mono-di-trimères d'acide galacturonique	acides digalacturoniques insaturés	acides oligogalacturoniques insaturés	acides méthyls oligogalacturoniques insaturés
activateurs	ions monovalents ou	divalents en faible con	centration	cations divalents	Ca ²⁺ indispensable	cations divalents

tab. 1.1. : [1] Les enzyme pectolytiques dégradant le squelette acide

1.2.1. Les enzymes dégradant les substances pectiques neutres

Les études concernant ce groupe d'enzymes sont assez confidentielles. Pourtant leur intérêt pour l'étude structurale des substances pectiques ainsi que dans certains procédés technologiques est important.

Les arabinanases

Les arabinofuranosidases sont pour la plupart des exo-L-arabinanases; elles agissent sur l'arabinofuranose terminal non réducteur en coupant aussi bien les liaisons (1-3) que (1-5) et en libérant de l'arabinose. Les arabinofuranosidases agissent également sur les polyosides contenant des motifs α -L-arabinofuranose terminaux en libérant de l'arabinose.

Des endo-L-arabinanases ont également été isolées. Elles hydrolysent exclusivement les liaisons α (1-5) entre résidus arabinofuranose. Leurs meilleurs substrats sont des arabinanes linéaires (déramifiées par une arabinofuranosidase) et les produits de la réaction sont des oligo-arabinosides (trimères, dimères, monomères). [6]

Les galactanases

Deux types de galactanases ont été isolées : d'une part des (1-4)- β -D-galactanases et d'autre part des (1-3),(1-6)- β -D-galactanases. Les premières agissent sur les galactananes linéaires ou sur les arabinogalactanes de type I. Elles ont été isolées principalement de *Bacillus subtilis* [7] et de *Penicillium citrinum* [8]. Une (1-3),(1-6)- β -D-galactanase a été purifiée à partir d'un champignon *Rhizopus niveus* [9].

1.2.2. Les enzymes dégradant le squelette acide

Ces enzymes sont classées en 2 grands groupes : d'une part les saponifiantes ou pectinestérases, d'autre part les dépolymérisantes qui catalysent des réactions d'hydrolyse ou de β -élimination. Le tableau 1.1. reprend leurs principales caractéristiques.

Les pectinestérases

Elles désestérifient les pectines en libérant du méthanol et en produisant des pectines de faible degré d'estérification et de l'acide pectique. (fig. 1.8.)

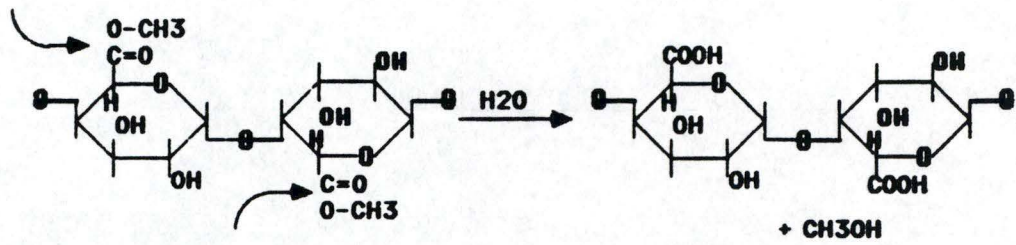


fig. 1.8. : Action des pectinestérases

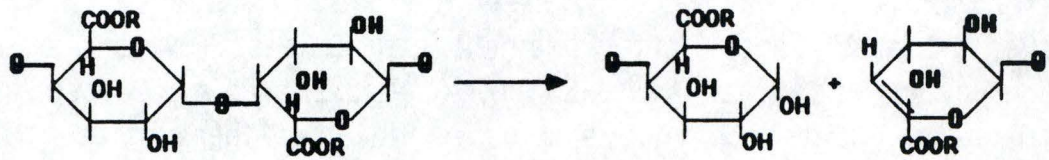


fig. 1.9. : Action des pectines-lyases

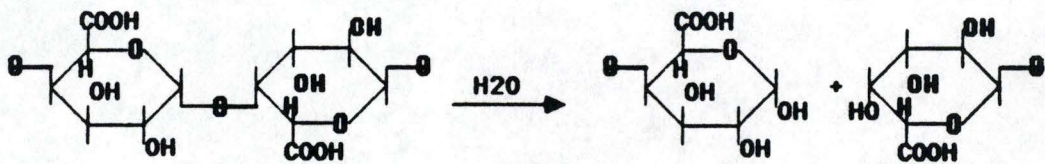


fig. 1.10. : Action des polygalacturonases

Elles sont spécifiques de l'acide galacturonique. Elles peuvent agir sur les esters éthyliques, propyliques et allyliques d'acide galacturonique mais avec des vitesses de réaction beaucoup plus faibles. Une séquence définie d'esters méthyliques d'acide galacturonique est nécessaire à leur action et elles sont incapables de déstérifier complètement les pectines. [10] La réaction est amorcée à l'extrémité réductrice ou à proximité d'un groupe carboxylique libre et procède linéairement sur une même chaîne donnant naissance à des blocs de groupements carboxyliques libres extrêmement sensibles aux ions Ca^{2+} .

Les pectate-lyases

Elles catalysent une β -élimination entre résidus d'acide galacturonique non estérifiés. (fig. 1.8) Les endopectate-lyases (endoPAL) attaquent au hasard la chaîne polygalacturonique, tandis que les exopectate-lyases (exoPAL) agissent à partir de l'extrémité réductrice en libérant des dimères. [10] Le meilleur substrat est une pectine de faible degré d'estérification pour les endoPAL et un pectate pour les exoPAL.

Les pectine-lyases

Les pectine-lyases catalysent une β -élimination entre résidus d'acide galacturonique estérifiés. (fig. 1.9) Toutes les pectine-lyases connues sont de type endo (endoPEL) et dépolymérisent les pectines hautement méthylées au hasard, provoquant une rapide chute de la viscosité. [11] Le taux de dépolymérisation et l'affinité des endoPEL décroissent avec la baisse du degré d'estérification du substrat. Le tétraméthyl-tétra-galacturonate est le plus petit substrat dégradé par l'enzyme.

Les polygalacturonases

Elles hydrolysent la liaison glycosidique en $\alpha(1-4)$ entre résidus d'acide galacturonique non estérifiés. (fig. 1.10.) On distingue les endopolygalacturonases (endoPG) qui attaquent au hasard les chaînes de polygalacturonates, induisant une rapide chute de viscosité, des exopolygalacturonases (exoPG) qui agissent à partir d'une extrémité réductrice en libérant de l'acide galacturonique. Quand elles agissent sur des pectates, les endoPG conduisent aux trimères, dimères et monomères de l'acide galacturonique. [10] Leur vitesse d'hydrolyse ainsi que le pourcentage final de liaisons rompues diminuent quand le degré d'estérification du substrat augmente. Les exoPG sont capables d'hydrolyser les dimères.

1.2.3. L'endopolygalacturonase de *Colletotrichum lindemuthianum* [12, 13]

L'endoPG de *C. lindemuthianum* est une enzyme qui a déjà fait l'objet de quelques publications. Selon English *et al.* (1972) [12], elle aurait un PM de 62.000 daltons. D'après Barthe *et al.* (1981) [13], elle ferait 37.000 daltons. Son pH optimum d'activité est de 5. L'endoPG de *C. lindemuthianum* est instable, en particulier à des concentrations inférieures à 3 µg/ml. De plus à concentration trop élevée, il semblerait que l'enzyme précipite de façon irréversible. Ceci se vérifie notamment par le fait que l'enzyme retrouve mal ses propriétés catalytiques après lyophilisation, ultrafiltration ou ultracentrifugation. L'endoPG coupe d'abord les chaînes pectiques au hasard, au niveau d'une séquence polygalacturonique, puis elle progresse à partir de ce point le long de la chaîne pectique en libérant des trimères, dimères et monomères d'acide galacturonique jusqu'à ce qu'elle atteigne une barrière, tel un point de branchement ou un sucre neutre dans la chaîne –un résidu rhamnosyl par exemple–.

L'endoPG secrétée par *C. lindemuthianum* peut à elle seule éliminer environ 75% de l'acide galacturonique des parois de cellules d'Erable sycomore et des parois d'hypocotyles de Haricot.

Deux protocoles de purification de l'endoPG ont déjà été décrits, l'un par English *et al.* (1972) [12], l'autre par Barthe *et al.* (1981) [13]. Ces méthodes fournissent une endoPG hautement purifiée mais présentent l'inconvénient d'être très lourdes (des volumes de milieu de culture supérieurs à 2 litres à dialyser et lyophiliser, des durées de purification de 8 jours,...). Dans ce mémoire, j'ai mis au point un protocole simplifié qui ne fournit pas une enzyme de pureté totale –l'électrophorèse sur gel d'acrylamide 12% fait apparaître 2 petites bandes contaminantes à côté de celle correspondant à l'endoPG– mais qui a le mérite d'être facile à mettre en oeuvre, d'être beaucoup plus rapide et d'avoir éliminé l'activité exoPG. Dans un des buts poursuivis au laboratoire –l'étude structurale des polysaccharides pariétaux des végétaux grâce notamment à l'utilisation d'enzymes attaquant spécifiquement certains motifs polysaccharidiques– on comprend combien l'activité exoPG associée à l'activité endoPG peut être gênante.

Avant d'entamer la description des méthodes utilisées pour produire l'endoPG, la purifier et la caractériser, nous consacrerons quelques paragraphes à la description de l'infection du haricot par *C. lindemuthianum* et au rôle de l'endoPG.

1.3. Physiologie de l'infection de *Phaseolus vulgaris* par *Colletotrichum lindemuthianum*

1.3.1. Cytologie de l'infection [17]

Colletotrichum lindemuthianum est un champignon Phycomycète, responsable de l'antracnose chez le Haricot commun, *Phaseolus vulgaris*. Selon la race du champignon et la variété du haricot, les symptômes de l'infection diffèrent, depuis l'unique cellule hypersensibilisée (annexe 1.2.) jusqu'à des lésions limitées ou de taille importante. Certaines variétés de *P. vulgaris* y sont résistantes.

Dans les tissus végétaux susceptibles, des vésicules intra-cellulaires se forment dans les cellules épidermiques à partir des conidiospores du champignon. Après moins de 24 heures de biotrophie, du mycélium primaire commence à se développer à partir des vésicules d'infection dans le tissu végétal, et le cytoplasme des cellules infectées dégénère progressivement. Quand les hyphes secondaires commencent à pousser, les cellules infectées sont mortes et les premières lésions apparaissent sur la plante.

Dans les tissus résistants, les vésicules d'infection ne se forment pas et le champignon reste confiné à l'intérieur d'une seule cellule épidermique hypersensibilisée. Cette cellule meurt et condamne la croissance du champignon.

Le processus initial d'infection par *C. lindemuthianum* sur des hypocotyles de haricots susceptibles est similaire dans le cas d'interaction compatible ou non. A 20° C, les conidiospores commencent à germer pour former des appressoria. De chaque appressorium émerge alors une structure digitiforme qui pénètre la cuticule et la paroi cellulaire épidermique. La pénétration de cette structure digitiforme se fait essentiellement à l'aide de cutinases. Une fois à l'intérieur d'une cellule épidermique, cette structure s'élargit fortement pour former une vésicule d'infection globulaire.

Environ 24 heures après la pénétration, un ou plusieurs hyphes primaires sortent de la vésicule d'infection. Ils ont un diamètre plus petit que celui de la vésicule et en sont séparés par un septum. Ces hyphes poussent intra-cellulairement, généralement entre la paroi cellulaire de l'hôte et le plasmalemme, pour envahir les cellules épidermiques et corticales adjacentes. Progressivement, les cellules infestées voient leur ultrastructure se désorganiser. Le volume cytoplasmique augmente tandis que le volume vacuolaire diminue. Le cytoplasme apparaît moins dense que dans les cellules normales. Le réticulum endoplasmique et les thylakoïdes

des chloroplastes se dilatent et le plasmalemme se rétracte de la paroi cellulaire.

Environ 48 heures après l'infection, des déchirures deviennent visibles dans le tonoplaste et le long de la membrane plasmique de nombreuses cellules.

60 heures après l'infection, le cytoplasme est complètement désorganisé : on ne trouve plus que des débris membranaires, parfois reconnaissables comme des fragments de plasmalemme ou de mitochondries.

Le microscope optique révèle des changements dans les cellules hôtes tels la rétraction du plasmalemme de la paroi cellulaire et l'arrêt des mouvements de cyclose 60 à 72 heures après l'infection. Cependant les symptômes macroscopiques n'apparaissent que 96 à 120 heures après l'infection, quand les tissus morts deviennent brun foncé. (voir Annexe) A ce moment, le mycélium primaire est à son extension maximale.

Peu après le brunissement du tissu, on observe une croissance accélérée du champignon correspondant à la sortie des hyphes secondaires hors des hyphes primaires. Ces hyphes secondaires ont un diamètre plus petit que celui des hyphes primaires. Ils poussent préférentiellement dans les parois cellulaires et envahissent rapidement les cellules environnantes, créant de larges lésions. Souvent, une goutte de liquide brunâtre en exsude, résultant de la macération cellulaire.

Après 6 à 8 jours, le tissu végétal autour du site d'inoculation est complètement remplacé par un stroma fongique dense. Après environ 10 jours, apparaissent les premiers conidiocystes.

1.3.2. Interactions hôte-pathogène compatibles et incompatibles

On distingue 2 grands types d'interaction entre une plante et un microbe pathogène :

- (1) dans les interactions incompatibles (hôte résistant, pathogène avirulent), une reconnaissance moléculaire précoce est suivie rapidement par une réponse de défense de la plante.
- (2) dans les interactions compatibles (hôte susceptible, pathogène virulent), le pathogène déjoue les mécanismes de surveillance de la plante et la maladie s'établit, prenant l'avantage sur les mécanismes de défense de la plante.

Dans beaucoup de cas, l'incompatibilité est caractérisée par une réponse dite d'hypersensibilité. Les cellules végétales sont hypersensibles au pathogène et lorsqu'une cellule est infectée, elle meurt rapidement et des système de défense sont immédiatement mis en oeuvre. [27]

Annexe I.1. : [26] les oligosaccharines

Les oligosaccharines sont des oligosaccharides, généralement libérés de la paroi végétale, qui agissent comme substances régulatrices ou messagers chimiques. Chaque oligosaccharine dirige une fonction particulière dans la défense de la plante contre les pathogènes ou la croissance et différenciation au cours du développement. Contrairement aux autres substances régulatrices bien connues des plantes, les hormones végétales (les auxines, les cytokinines, les gibbérellines, l'éthylène et l'acide abscissique) qui exercent des effets pléiotropiques, les oligosaccharines ont chacune une action bien spécifique.

Les oligosaccharines sont en fait des fragments découpés dans la paroi cellulaire par des enzymes particulières : chaque enzyme libère une oligosaccharine particulière. A moins que ces enzymes soient directement libérées par un pathogène, il semble qu'en conditions physiologiques normales, les substances pléiotropiques comme les auxines et les gibbérellines, activent dans la paroi cellulaire les enzymes responsables de la libération des oligosaccharines. Comme pour les hormones animales, il semble donc qu'une hiérarchie hormonale existe aussi chez les végétaux.

Les moyens de défense de la plante et les éliciteurs [49]

Les plantes répondent aux attaques microbiennes en synthétisant *de novo* une série d'antibiotiques et protéines destinées à limiter la croissance du pathogène. Des complexes anti-microbiens de bas poids moléculaire, appelés phytoalexines, sont produits par un grand nombre de plantes. Des enzymes, tels la chitinase et la β (1-3) glucanase, qui dégradent des polysaccharides de parois fongiques peuvent être synthétisées suite à une attaque fongique. [50, 51] En outre, en réponse à une infection, la paroi cellulaire est renforcée par des dépôts de glycoprotéines riches en hydroxylproline (HRGP), de lignine et autres composés phénoliques de la paroi végétale. [52, 53]

La synthèse de phytoalexines et autres protéines de défense peut être déclenchée par des facteurs endogènes libérés suite à des dommages cellulaires ou par des facteurs propres au pathogène. Ces dernières molécules sont appelées "éliciteurs". Il s'agit de glycoprotéines, de complexes polysaccharidiques (on parle alors d'oligosaccharines, annexe I.1.) [54, 55] et de certains acides gras [56]. Il semble que ces molécules interagissent avec des récepteurs spécifiques des plantes. [57]

Les éliciteurs sont pour la plupart non spécifiques : l'éliciteur isolé d'une race donnée d'un pathogène peut être actif sur différents cultivars de plantes, même sur ceux où le pathogène est avirulent. Si les éliciteurs peuvent déclencher des moyens de défense, ils ne déterminent donc pas pour autant le type d'interaction qui s'établit entre un hôte et son pathogène : interaction compatible ou interaction incompatible. C'est ainsi que maintenant, les phytopathologistes étudient l'induction de gènes de défense lors d'interactions compatibles et non compatibles.

Interactions compatibles et incompatibles entre *Phaseolus vulgaris* et *Colletotrichum lindemuthianum*

La phenyl ammonium lyase (PAL) et la chalcone synthase (CHS) sont 2 enzymes clefs dans la synthèse de certaines phytoalexines de type isoflavonoïde, extrêmement fongitoxiques. Lors d'une interaction incompatible entre *Phaseolus vulgaris* et *Colletotrichum lindemuthianum*, les taux de synthèse des mRNA de la PAL et de la CHS augmentent fortement peu de temps après l'inoculation, quand aucune lésion cellulaire n'est encore apparente. Ces gènes ne sont pas induits uniquement dans les cellules infectées, mais aussi jusqu'à une certaine distance du site d'infection. [58, 59] Ceci implique donc un "mécanisme d'avertissement intercellulaire". Une chitinase est rapidement induite au cours d'une interaction incompatible. [50] Il est possible que des oligomères de chitine, libérés par l'activité

chitinase soient des messagers chimiques –des oligosaccharines– responsables de ce mécanisme de transduction intercellulaire. [49] Dans l'interaction incompatible entre le haricot et son pathogène, les mRNA des HRGP augmentent également de façon précoce. [52]

Lors d'une interaction compatible entre *P. vulgaris* et *C. lindemuthianum*, ces gènes de défense ne sont induits que bien plus tard, quand le champignon s'est déjà bien développé dans le tissu végétal et que les premières lésions (nécrose cellulaire et brunissement tissulaire) sont apparentes. [58, 59] Cette induction est en corrélation avec le développement des hyphes secondaires qui marque le passage du mode de croissance biotrophique du champignon au mode nécrotrophique. [17] Dans ce cas, l'activation des gènes peut être due à la perception des dégâts cellulaires plutôt qu'à une reconnaissance moléculaire directe du champignon en extension. Des fragments de paroi cellulaire fongique et végétale pourraient bien jouer un rôle, en tant que messagers chimiques ou oligosaccharines pour signaler le stress. [26]

1.4. Polygalacturonases et Pathogenèse

1.4.1. Le rôle des enzymes pectolytiques dans la pathogenèse chez les plante [14]

Les substances pectiques de la paroi primaire et de la lamelle mitoyenne chez les végétaux sont vulnérables enzymatiquement. Parce que ces polymères offrent un support aux protoplastes turgescents, une barrière à la pénétration des pathogènes et une source éventuelle d'oligosaccharines, leur dégradation par des enzymes microbiennes peut avoir divers effets sur les interactions hôte-parasite.

On attribue aux enzymes pectolytiques un rôle déterminant dans la pathogenèse. Celles-ci sont sécrétées par nombre de pathogènes, causant la macération du tissu végétal, la perte d'électrolytes et la mort cellulaire. Des pectinases hautement purifiées peuvent en effet macérer et tuer des tissus végétaux d'une manière similaire.

La désorganisation de la paroi cellulaire est évidente lors de l'infection par de nombreux pathogènes végétaux. Cette désorganisation peut être sévère comme dans les pourritures molles [15] où les cellules finissent par perdre leur cohésion, ou plus limitée comme lors de la pénétration d'hyphes mycéliens à travers la paroi cellulaire [16].

On a démontré pour plusieurs pathogènes que les enzymes dégradant les parois cellulaires végétales sont sécrétées séquentiellement. Généralement, les pectinases sont libérées en premier lieu, "préparant le terrain" pour l'action ultérieure des autres enzymes dégradant la paroi. Ainsi, un traitement préalable avec une endoPG est nécessaire pour une dégradation ultérieure de la paroi par d'autres enzymes comme la cellulase, l'arabinosidase et la pronase. [12]

Enfin, on a montré assez récemment que des oligosaccharides libérés de la paroi cellulaire par des enzymes pectolytiques peuvent amorcer chez la plante des réactions de défense. [3]

1.4.2. Le rôle des polygalacturonases de *C. lindemuthianum* lors de la formation des lésions chez le haricot

La croissance lente du mycélium primaire cause peu de dégâts aux parois cellulaires hôtes. Cependant l'émergence des hyphes secondaires peu après le brunissement du tissu végétal marque un tournant dans le mode de parasitisme du champignon. Les hyphes secondaires croissent généralement à l'intérieur des parois cellulaires hôtes et les dissolvent grâce à leurs enzymes pectolytiques, essentiellement les polygalacturonases. La dissolution de la paroi est associée à une mort rapide du protoplaste hôte; le tissu végétal macère. En effet, lorsque la paroi cellulaire devient déficiente, elle ne parvient plus à supporter la pression de turgescence du protoplaste. Ce dernier finit par éclater, libérant son contenu cellulaire.

La réponse d'une plante de haricot au pathogène dépend notamment de sa capacité à inhiber l'activité de l'endoPG sécrétée par le champignon. On a prouvé que des parois cellulaires de plusieurs variétés de *P. vulgaris* contiennent des protéines qui inhibent spécifiquement les endoPG de *C. lindemuthianum*. [18,19]

II. Production de Polygalacturonases de *Colletotrichum lindemuthianum* (β) par fermentation en milieu liquide

II.1. Résumé

La présence d'acide polygalacturonique dans le milieu de culture de *C. lindemuthianum* (β) induit la production par ce dernier d'enzymes à activité PG. Cette production par fermentation en milieu liquide n'est pas constitutive. En outre, elle n'est soumise à la répression catabolique ni par le glucose, ni par l'acide galacturonique.

Au cours d'une fermentation en milieu liquide contenant de l'acide polygalacturonique comme source de carbone, les évolutions dans le surnageant de culture de l'activité PG, du pH, des acides uroniques et des sucres réducteurs sont caractéristiques. Un pic d'activité PG est rapidement atteint. Le pH augmente tandis que les acides uroniques disparaissent du surnageant. Les sucres réducteurs augmentent avant de chuter après quelques jours. L'augmentation résulte de la libération par fermentation de monomères, dimères et trimères de l'acide galacturonique; la diminution de leur métabolisation par le champignon.

II.2. Matériel et méthode

II.2.1. Culture de *Colletotrichum lindemuthianum*

L'endoPG de *C. lindemuthianum* est produite par fermentation en milieu liquide. L'inoculation du milieu liquide se fait avec les spores de *C. lindemuthianum* qui ont été obtenues au préalable sur un milieu solide de sporulation. La composition du milieu solide est la suivante :

(proportions pour 1 litre de milieu)

-maltose (Sigma)	10,0 g
-NH ₄ NO ₃ (Merck)	1,2 g
-MgSO ₄ , 7H ₂ O (Merck)	0,5 g

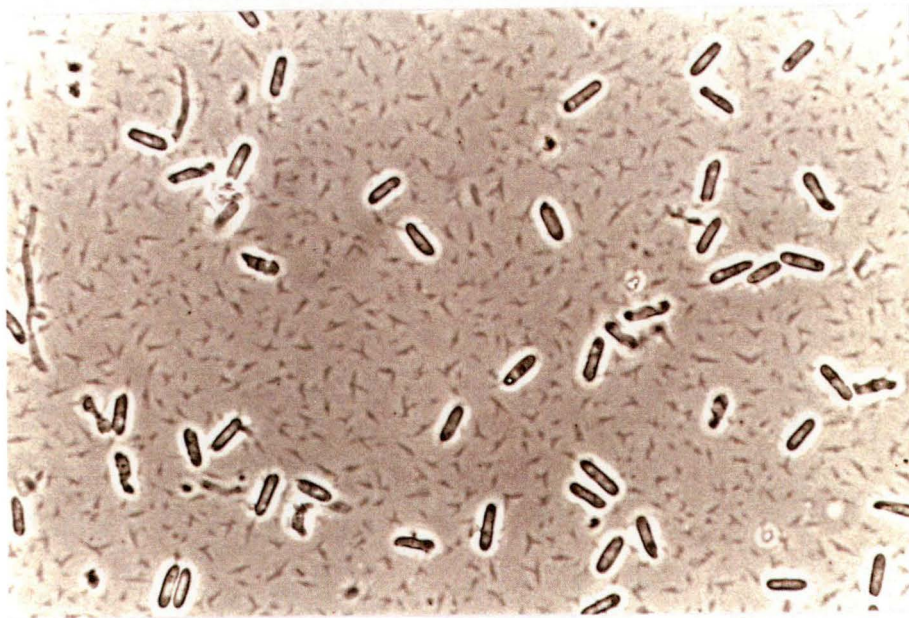
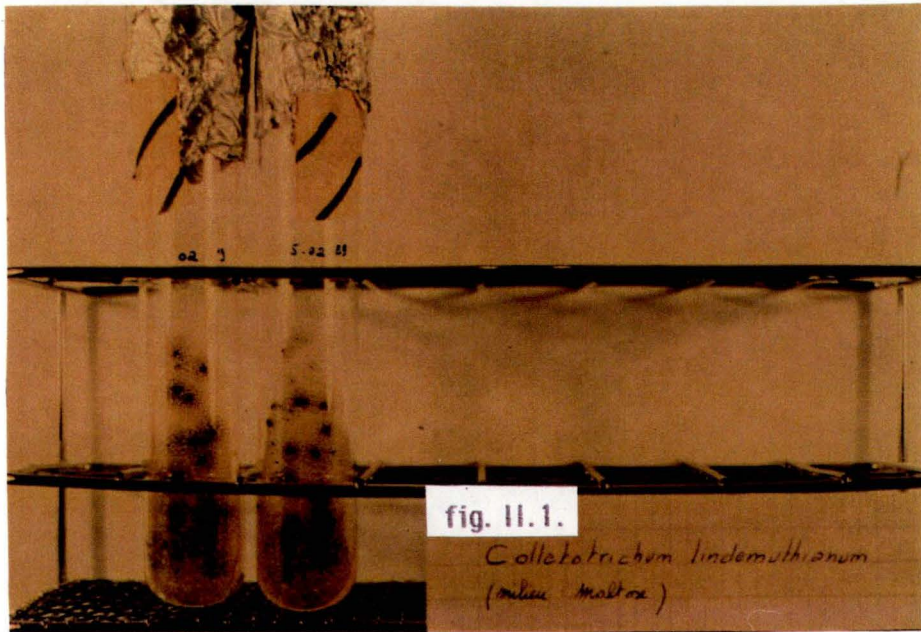


fig. 11.2. : conidiospores de *Colletotrichum lindemuthianum*
(grossissement 1000 x)

-K ₂ HPO ₄ (Merck)	1,0 g
-FeCl ₃ · 6H ₂ O (Merck)	1,3 mg (1 ml solution 260 mg/200 ml)
-ZnSO ₄ · 7H ₂ O (Merck)	0,9 mg (1 ml solution 180 mg/200 ml)
-MnSO ₄ · H ₂ O (Merck)	0,1 mg (1 ml solution 20 mg/200 ml)
-Thiamine (Fluka)	0,1 mg (1 ml solution 20 mg/200 ml)
-Biotine (Sigma)	0,05 mg (0,5 ml solution 20 mg/200 ml)
-Agar (Sigma)	15,0 g
-H ₂ O	porter à 1 litre

ajuster à pH 6

Le milieu est réparti en volumes de 10 ml dans des tubes de culture (15 cm x 2,5 cm). Ces derniers sont bouchés avec une bourre d'ouate et recouverts de papier aluminium. Les tubes sont autoclavés 20 min. à 120°C sous 1 bar de pression. On les laisse refroidir inclinés.

On repique stérilement le champignon et après 10 jours (fig. II.1.) on peut inoculer le milieu liquide avec les spores (fig. II.2.) : on ajoute 10 ml d'eau désionisée stérile dans un tube, on agite au Vortex, on récupère la solution de spores et on dilue à une densité de $2 \cdot 10^6$ spores par ml (le comptage est réalisé au moyen de la cellule de Fush-Rosenthal sur microscope optique). On inocule le milieu liquide avec la solution de spores en proportion 1:50.

La composition du milieu liquide est la même que celle du milieu solide, sauf qu'il n'y a pas d'agar et que le maltose est remplacé par une même quantité de pectine (acide homopolylgalacturonique, Sigma) ou par une autre source de carbone.

Le milieu liquide est réparti à raison de 80 ml par erlenmeyer de 250 ml. Ceux-ci sont bouchés et autoclavés comme décrit précédemment.

Ils sont inoculés avec 1,6 ml d'une solution de spores à $2 \cdot 10^6$ /ml. Chaque erlenmeyer est ensuite placé à l'obscurité, à 25°C, à 100 tours/min. sur agitateur rotatif.

II.2.2. Mesure de poids sec du champignon après fermentation

Le mycélium est séparé du surnageant de culture par filtration sur verre fritté. Il est transféré dans une petite boîte de Pétri tarée préalablement, puis le tout est placé dans une étuve à 56°C. Après 24 heures, le poids sec du mycélium en est déduit avec une précision de 10^{-4} g.

II.2.3. Mesure du pH

Le pH du surnageant de culture est mesuré par un pH-mètre Consort P614 avec une électrode combinée Radiometer GK2321C recalibrée avant chaque série de mesures.

II.2.4. Dosage des acides uroniques [20]

Principe :

Sous l'action de l'acide sulfurique, les polysides sont hydrolysés en oses neutres et acides uroniques. Les monomères libérés sont déshydratés en dérivés furfuroïques qui forment avec le methydroxybiphénile un complexe de couleur rose présentant un maximum d'absorption à 520 nm.

Réactifs :

-solution de Methydroxybiphényl (MHBP) : 0,15 g MHBP (Aldrich) dans 100 ml d'une solution aqueuse de NaOH 0,5 g/100 ml. Conserver à 4°C, à l'abri de la lumière.

-H₂SO₄ conc.

Procédure :

-pipetter 1 ml d'échantillon à doser (maximum 100 mg d'acide uronique) dans un tube à essais.

-ajouter 6 ml de H₂SO₄ conc.

-placer 5 min. dans un bain d'eau à 100°C.

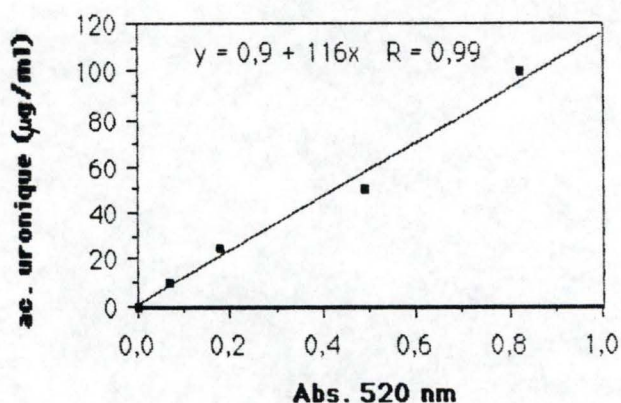
-refroidir et ajouter 100 µl de la solution de MHBP.

-vortexer et laisser refroidir environ 15 min. jusqu'à température ambiante.

-mélanger puis lire l'absorbance à 520 nm.

Etalonnage :

concentration (µg/ml)	Abs. 520 nm
0	0,000
10	0,069
25	0,175
50	0,490
100	0,823



II.2.5. Dosage des sucres réducteurs [21, 22]

Principe :

Par chauffage dans des conditions alcalines, l'acide dinitrosalicylique est réduit par les sucres réducteurs en un complexe nitroaminé hautement coloré qui est dosé à 540 nm.

Réactif :

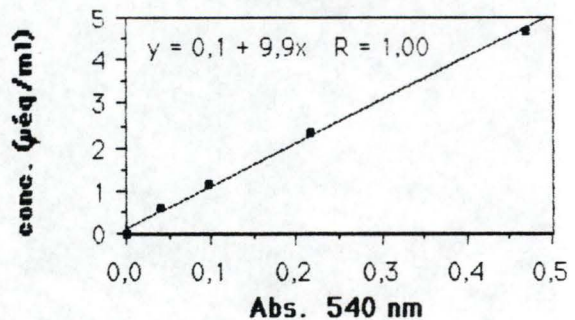
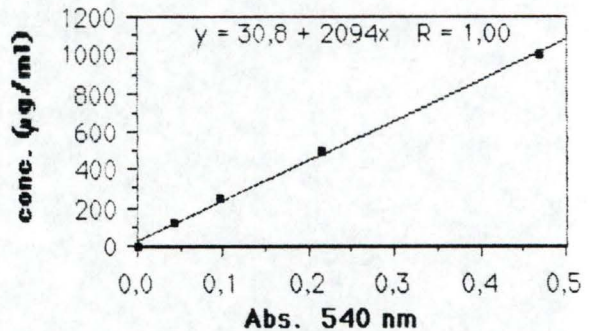
-solution de Dinitrosalicylate (DNS) : dissoudre 8 g de NaOH, 150 g de tartrate double $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ et 5 g d'acide dinitrosalicylique (Aldrich) dans de l'eau et porter à 500 ml.

Procédure :

- pipetter 1 ml d'échantillon à doser dans chaque tube.
- ajouter 1 ml de réactif.
- placer 5 min. dans un bain-marie à 100°C.
- ajouter 10 ml d' H_2O et lire l'absorbance à 540 nm.

Etalonnage :

concentration		Abs. 540 nm
ac. galacturonique ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	($\mu\text{éq}/\text{ml}$)	
0	0	0,000
125	0,59	0,041
250	1,18	0,097
500	2,36	0,215
1000	4,72	0,469



II.2.6. Dosage de l'activité polygalacturonase

L'hydrolyse d'une liaison glycosidique $\alpha(1-4)$ de l'acide polygalacturonique par

une PG libère un groupe réducteur (cfr. introduction p. 8). L'activité PG est déterminée en mesurant le nombre de groupes réducteurs libérés par unité de temps lorsque l'enzyme est incubée avec son substrat, l'acide polygalacturonique.

Une unité enzymatique est définie comme étant la quantité d'enzyme capable d'hydrolyser, pendant 1 heure à 40°C, 1 μ mole de liaisons glycosidiques $\alpha(1-4)$ de l'acide polygalacturonique 0,1% dans un tampon acétate 50 mM - pH5,2.

Réactifs :

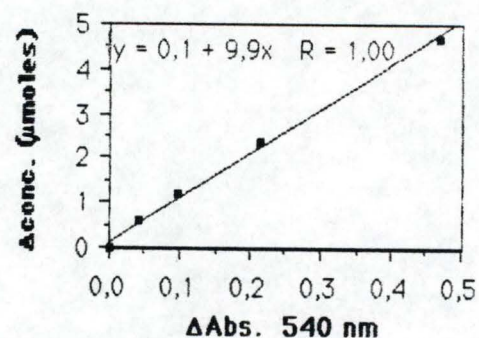
- substrat : acide homopolygalacturonique (Sigma) 0,1% dans un tampon acétate de sodium 50 mM - pH 5,2.
- DNS : cfr. dosage des sucres réducteurs

Procédure standard :

- pipetter 1 ml de substrat dans des tubes à essais.
- placer dans un bain thermostaté à 40°C et attendre 5 min. pour que la température du substrat s'équilibre à 40°C.
- ajouter 100 μ l de solution enzymatique à doser.
- incuber 30 min.
- ajouter 1 ml de DNS (la solution de DNS bloque instantanément l'activité enzymatique).
- pour les blancs, bloquer immédiatement la réaction : ajouter 1 ml de DNS puis 100 μ l d'enzyme.
- doser les sucres réducteurs comme décrit précédemment.

Etalonnage :

Nbre. de liaisons hydrolysées (=Variation conc. sucres réducteurs après 30 min.) (μ moles)	Δ Abs. 540 nm
0,00	0,000
0,59	0,041
1,18	0,097
2,36	0,215
4,72	0,469



II.2.7. Chromatographie sur couche mince de silice [23]

Les produits de dégradation de l'acide homopolygalacturonique par fermentation fongique peuvent être analysés globalement par chromatogra-

phie ascendante sur couche mince de silice. L'éluant est un mélange n-butanol, acide acétique, H₂O dans les proportions 2,1,1 respectivement. Les plaques de chromatographie sont révélées par vaporisation d'une solution d'orcinol 0,1% H₂SO₄ 70% et chauffage à 100°C pendant 10 min..

II.3. Résultats et commentaires

II.3.1. Influence de la source de carbone sur la production d'enzymes a activité polygalacturonase

Six milieux liquides, différant par leur source en carbone, ont été inoculés par *C. lindemuthianum* (β). Trois jours plus tard, les surnageants ont été testés pour l'activité PG : 5 ml ont été prélevés de chaque milieu, dialysés 24 heures à 4°C contre un tampon acétate de sodium 50 mM - pH 5,2 avant de doser l'activité PG.

Les résultats suivants ont été obtenus :

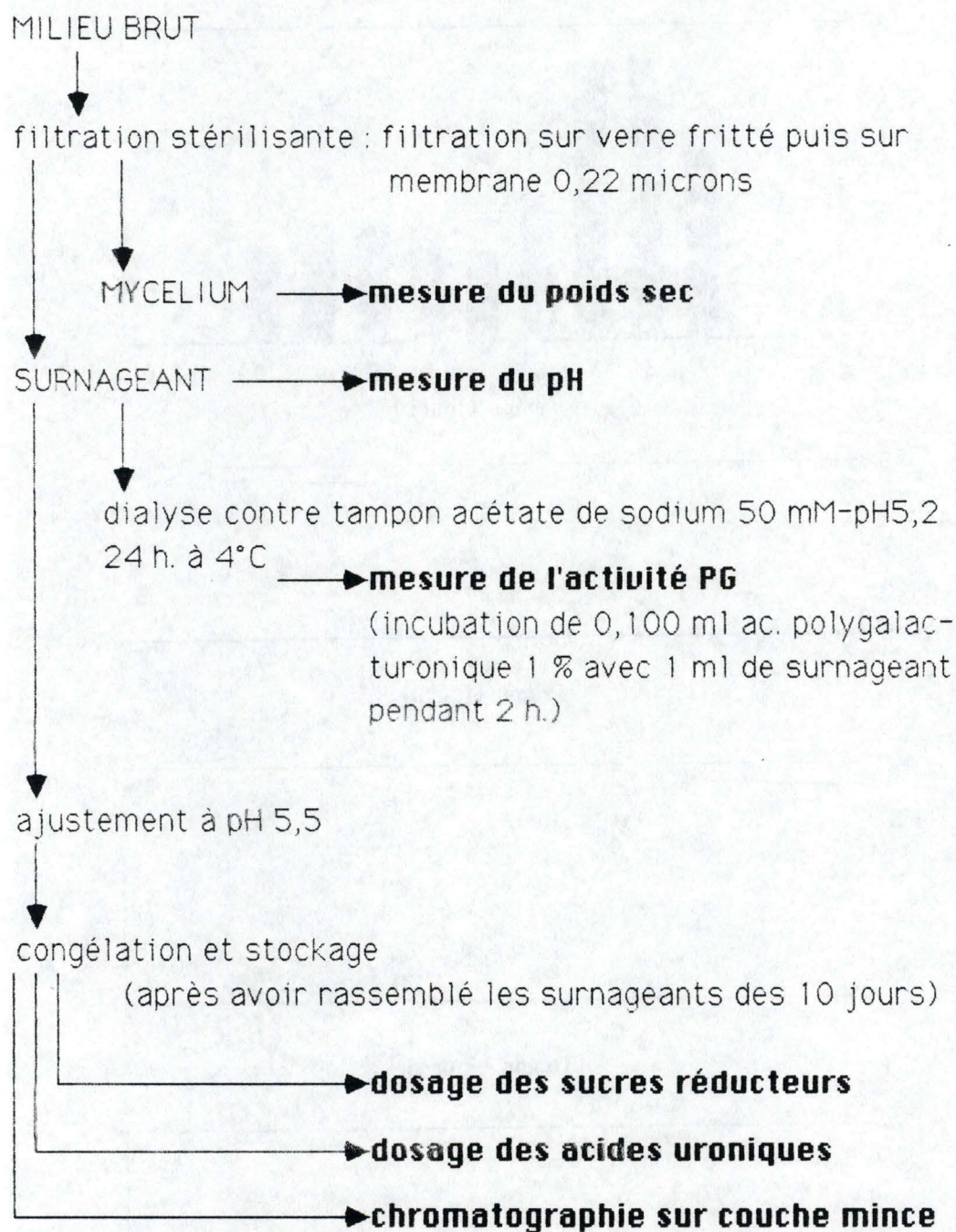
milieu (source de C)	croissance	activité PG
1. pectine 1%	bonne	oui
2. glucose 1%	bonne	non
3. acide galacturonique 1%	bonne	non
4. sucrose 1%	bonne	non
5. pectine 1% + glucose 1%	bonne	oui
6. pectine 1% + acide galacturonique 1%	bonne	oui

Ces résultats montrent que la production de PG par *C. lindemuthianum* n'est pas constitutive; elle est inductible par la présence de son substrat dans le milieu de culture. En outre, sa production n'est soumise à la répression catabolique ni par le glucose, ni par l'acide galacturonique.

II.3.2. Variations de quelques paramètres physiques et biochimiques et évolution de l'activité polygalacturonase au cours d'une fermentation

Douze erlenmeyers contenant 80 ml de milieu liquide chacun ont été inoculés

Annexe II.1. : Prise des mesures



Poids sec (mg)

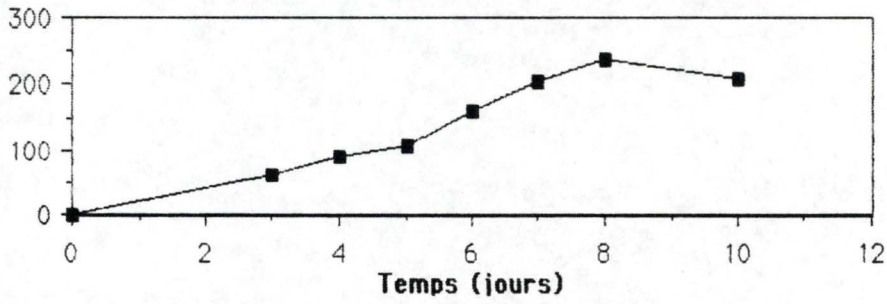


fig. II. 3.

Activité PG (Δ Abs. 540nm/2h)

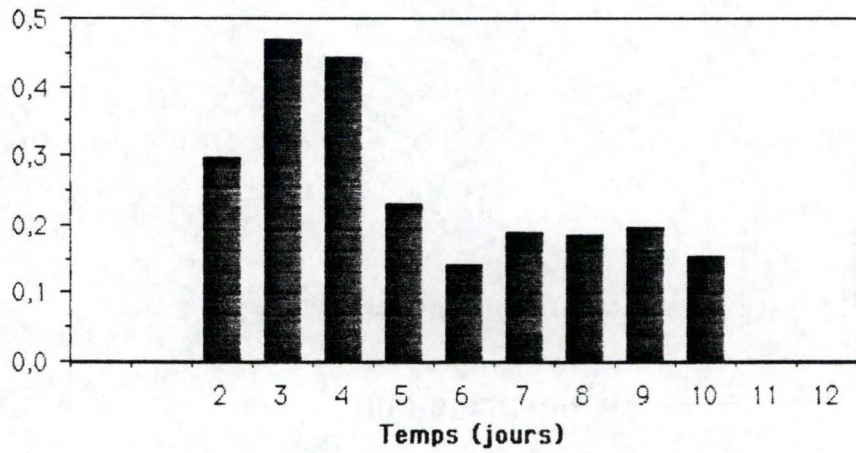


fig. II. 4.

pH

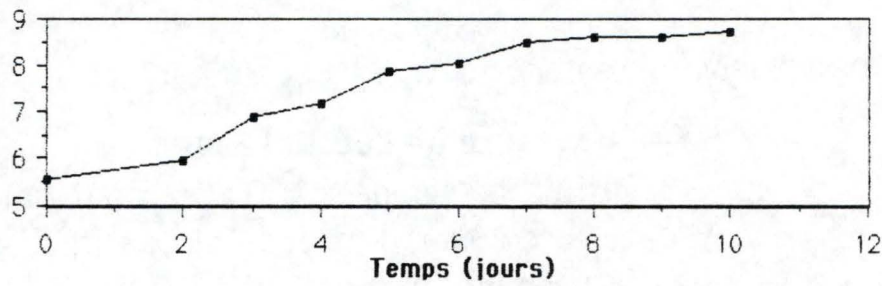


fig. II. 5.

ac. uroniques (mg/ml)

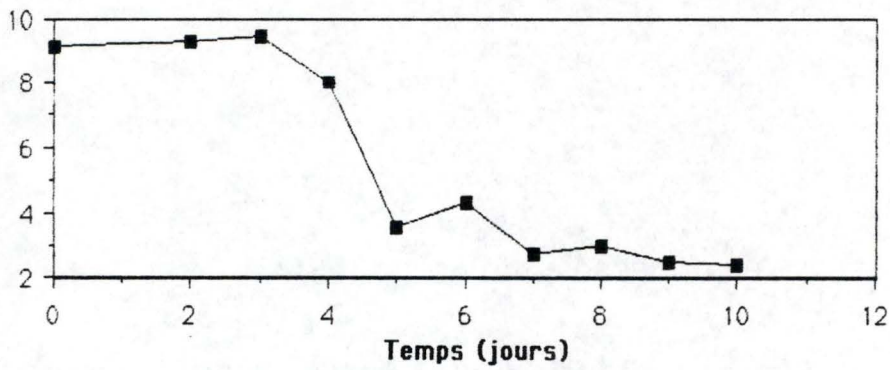


fig. II. 6.

sucres réd. (μ éq./ml)

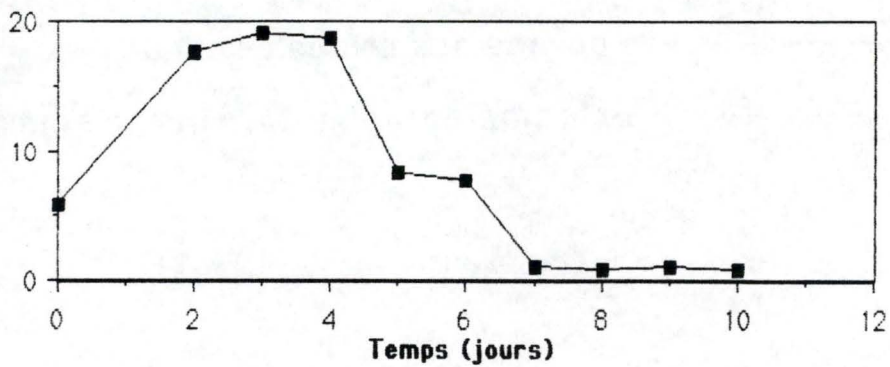


fig. II. 7.

en même temps avec une même quantité de spores. Une fermentation de 10 jours a été lancée. Chaque jour, une série de mesures a été effectuée sur le milieu de culture d'un erlenmeyer (annexe II.1.).

Les résultats de ces mesures sont présentés aux figures II.3. à II.7. . La figure II.8. montre les résultats d'une chromatographie sur couche mince de silice des contenus en oligomères de l'acide galacturonique dans le surnageant au cours de la fermentation.

Les variations temporelles des différents paramètres étudiés résultent en fait de l'activité PG dans le milieu de culture. (fig. II.4.) Les PG ont pour rôle principal d'hydrolyser les polygalacturonates en oligogalacturonates assimilables. Aussi, les premières modifications biochimiques dans le milieu sont :

- une élévation du dosage des groupes réducteurs des acides uroniques (l'hydrolyse d'une liaison glycosidique libère chaque fois un groupe réducteur; voir introduction p.8). (fig. II.7.)
- l'apparition de monomères et oligomères d'acide galacturonique à partir de l'acide polygalacturonique. (fig. II.8.)

Ces produits d'hydrolyse sont ensuite absorbés par les hyphes mycéliens et commencent à disparaître rapidement du milieu dès le quatrième jour. (fig. II.7. et II.8.) Parallèlement, la concentration en acide uronique libre diminue. (fig. II.6.) Il s'ensuit l'augmentation du pH. (fig. II.5.)

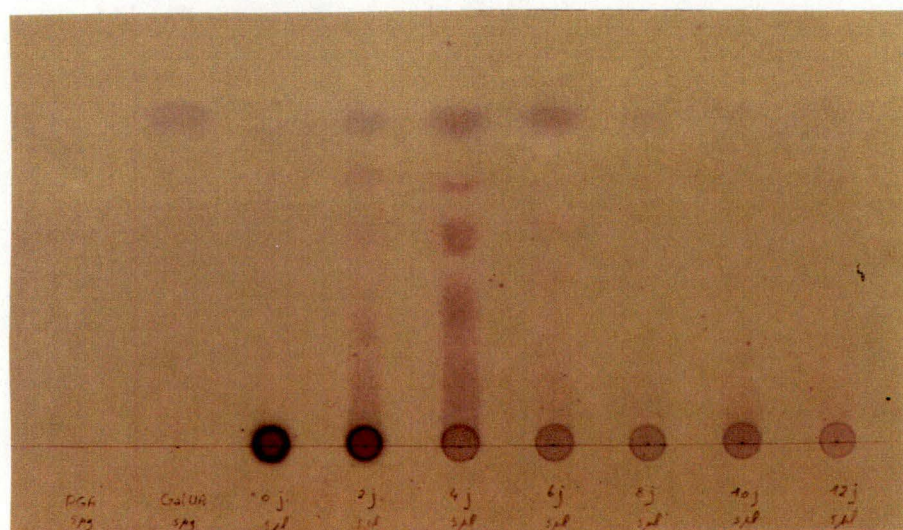


fig. II.8. : Chromatographie sur couche mince des produits de dégradation de l'acide polygalacturonique résultant de la fermentation par *Colletotrichum lindemuthianum*.

De l'acide polygalacturonique (PGA) et de l'acide galacturonique (GalUA) ont été utilisés comme témoins. Cinq μ l de surnageant de culture de 0, 2, 4, 6, 8, 10 et 12 jours ont été déposés par piste.

III. Purification de l'endopolygalacturonase de *Colletotrichum lindemuthianum* (β)

III.1. Résumé

Un protocole simple de purification de l'endoPG de *C. lindemuthianum* a été mis au point. Il repose sur la grande affinité de l'enzyme vis-à-vis d'un gel échangeur cationique CM Sephadex C-50. Ce protocole ne fournit pas une enzyme de pureté totale -l'électrophorèse SDS-PAGE sur gel de polyacrylamide 12 % fait apparaître 2 petites bandes contaminantes à côté de celle correspondant à l'endoPG- mais il a le mérite d'être facile à mettre en oeuvre, d'être rapide et d'avoir éliminé l'activité exoPG interférant avec l'activité endoPG dans le surnageant de culture.

III.2. Matériel et méthodes

III.2.1. Dosage des protéines : méthode de Lowry [28]

Principe :

Sous l'action de l'hydroxyde de sodium, les protéines sont dénaturées et présentent tous leurs groupes réactionnels. La formation d'un complexe entre le cuivre et les liaisons peptidiques d'une part, et la réduction d'un complexe phosphomolybdique du réactif de Folin en complexe phosphomolybdeux par les groupes tyrosine et tryptophane des protéines d'autre part, font apparaître une coloration bleue.

Réactifs :

- A. Na_2CO_3 2% dans NaOH 0,10 N
- B. $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0,5% dans tartrate sodium-potassium 1%
- C. 50 ml A + 1 ml B (extemporané)
- D. Réactif de Folin : solution stock (produit Merck)

Procédure : (pour 25 à 500 μg protéines/ml)

Dans une batterie de tubes à essai, déposer 0,2 ml de chaque échantillon à

Activité endoPG (unités enz.) Sucres réducteurs ($\mu\text{eq/ml}$)

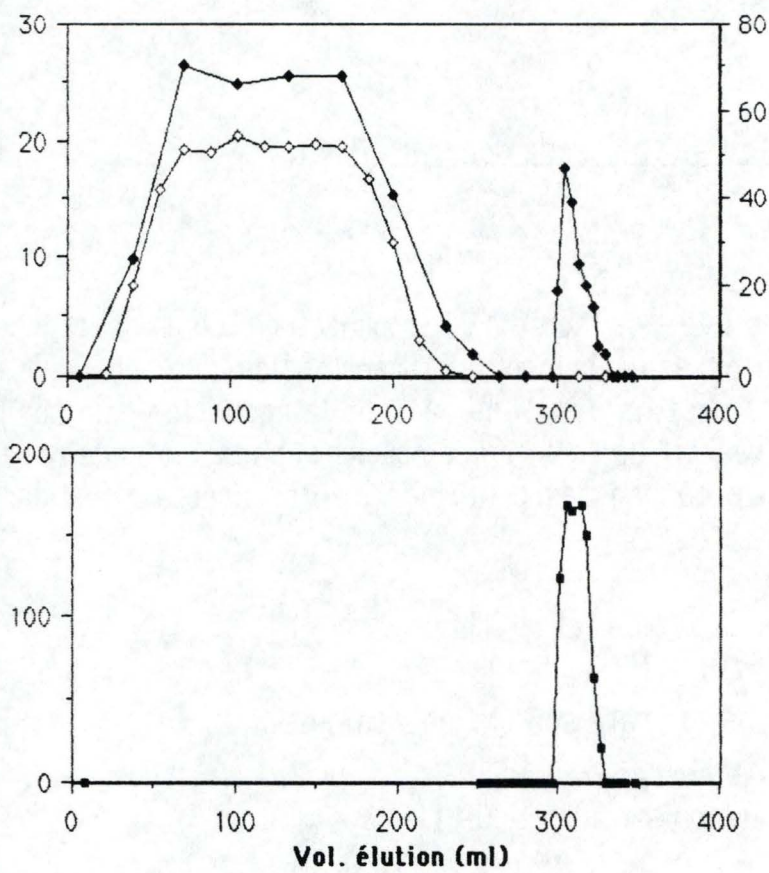


fig. III.1. : profil d'élution en sortie de colonne CM Sephadex C-50

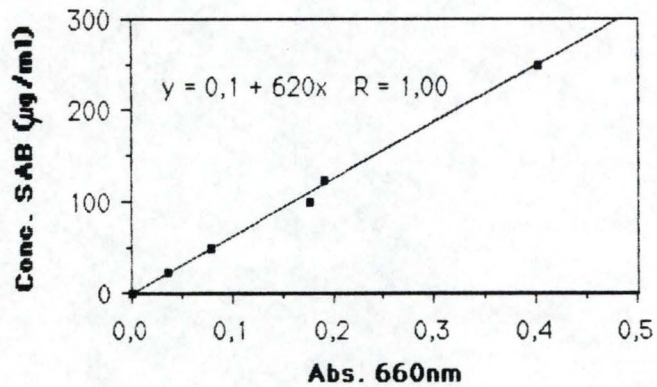
doser et 1 ml du réactif C. Vortexer. Après 30 minutes d'incubation à température ambiante, on ajoute 0,1 ml du réactif E, de minute en minute, dans chaque tube. Après 30 minutes, et de minute en minute, on lit l'absorbance de chacun des échantillons à 660nm.

Micro-procédure : (pour moins de 25 µg de protéines/ml)

On dépose dans ce cas 0,5 ml d'échantillon à doser et 0,5 ml de réactif C deux fois concentré (50 ml A + 2 ml B). Pour le reste on procède comme ci-dessus, sauf qu'on lira l'absorbance à 750 nm.

Etalonnage

SAB/Acétate (µg/ml)	Abs. 660 nm
0	0,000
25	0,037
50	0,079
100	0,177
125	0,190
250	0,401



III.2.2. Protocole de purification de l'endoPG de *C. lindemuthianum*

Toutes les opérations qui suivent se font à 4°C.

Un milieu de culture (200 ml)ensemencé depuis 3 jours est filtré successivement sur 2 filtres Millipore en fibres de verre GF/A 1,6 µm puis sur une membrane d'acétate de cellulose 0,2 µm à l'aide d'un dispositif Sartorius. On élimine ainsi le mycélium et les spores en suspension.

Le filtrat est ajusté à pH 5,2 par de l'HCl 0,5 M. Il est ensuite passé, à la vitesse de 25 ml/h, sur une colonne de CM Sephadex C-50 (2,5 x 10 cm) préalablement équilibrée dans un tampon acétate 50 mM - pH 5,2. (fig. IV.5.)

Dans ces conditions, l'endo PG est retenue par le gel échangeur. Un rinçage est ensuite effectué par 50 ml de tampon acétate 50 mM - pH 5,2. L'éluion qui décroche l'endoPG de la colonne est réalisée par un tampon acétate 50mM, NaCl 500 mM, pH 5,2.

Tout au cours de la chromatographie, des fractions de 4 ml sont recueillies. Dans chacune de ces fractions, les sucres réducteurs, les protéines et l'activité PG sont dosés. La fig III.1. montre comment ceux-ci évoluent

pendant la chromatographie. Les fractions contenant l'activité PG sont réunies et dialysées une nuit contre un tampon acétate 50 mM - pH 5,2. Cette dernière fraction constitue la solution enzymatique purifiée.

III.2.3. Electrophorèse SDS-PAGE : méthode de Laemmli [29]

Gel de polyacrylamide

Le gel de polyacrylamide résulte de la polymérisation de monomères d'acrylamide en longues chaînes pontées avec du méthylènebisacrylamide. La polymérisation est initiée par des catalyseurs produisant des radicaux libres, généralement le persulfate d'ammonium et le NNN'N' tétraméthylènediamine (TEMED). Elle est inhibée en présence d'un excès d'O₂. La réticulation du gel, qui dépend du pourcentage d'acrylamide et de bisacrylamide, influence la mobilité électrophorétique des protéines. Cette dernière diminue si la taille des pores diminue. La mobilité électrophorétique dépend également de la charge des protéines.

SDS-PAGE

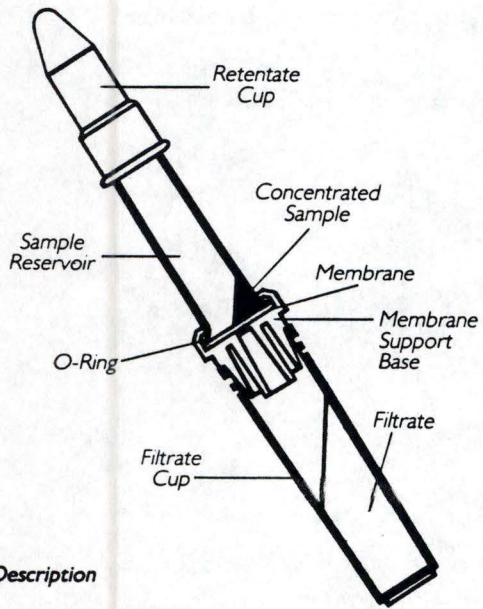
En présence de Sodium Dodécyl Sulfate (SDS), la mobilité électrophorétique des protéines dans le gel est directement proportionnelle au logarithme du PM des protéines. Le SDS est un détergent anionique. En présence d'un excès de SDS et d'un réducteur des ponts disulfures (β -mercaptoéthanol), les protéines se déroulent et perdent leur structure tridimensionnelle. De nombreuses molécules de SDS se fixent via leur queue hydrophobe aux protéines et les rendent toutes négatives, quelle que soit leur charge de départ puisque le SDS est chargé négativement.

Le gel de polyacrylamide se compose dans sa partie supérieure d'un gel d'empilement lâche (stacking gel) dont le rôle est de concentrer l'échantillon, et dans sa partie inférieure d'un gel de séparation de réticulation définie (running gel), dans lequel les différentes protéines vont se séparer selon leur PM.

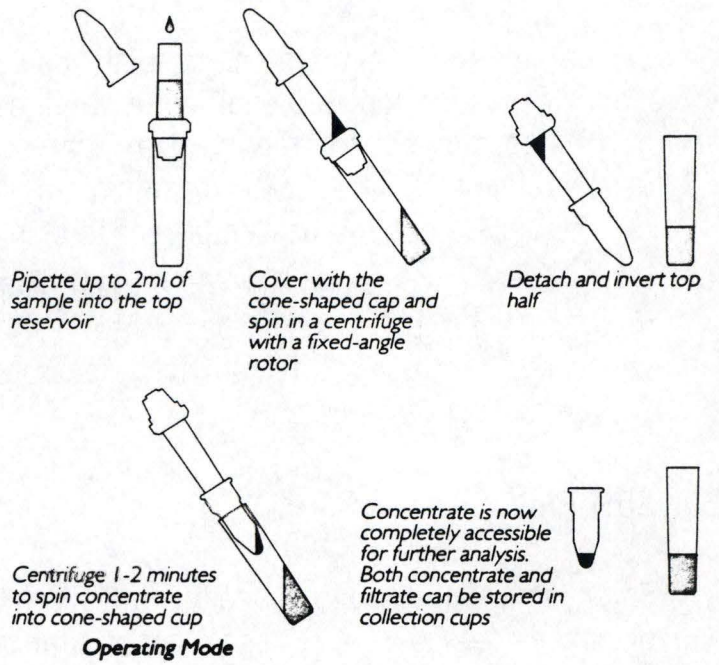
Préparation des échantillons pour l'électrophorèse

Les protéines qui sont soumises à l'électrophorèse sont solubilisées dans un mélange 5 fois concentré.

Annexe III.1. : concentration des échantillons par le système Centricon (Amicon)



Unit Description



Mélange 5X conc. (solubilisant) :

- SDS (LKB) 10%
- Tris 250 mM - pH 8,8
- 2- β -Mercaptoéthanol (Fluka) 10%
- Glycérol (Fluka) 50%
- Bleu de Bromophénol (Merck) 0,25%

On solubilise un volume de protéines avec quatre volumes de ce mélange 5X concentré. Le SDS et le mercaptoéthanol dénaturent les protéines comme expliqué précédemment. Le glycérol alourdit les échantillons et les empêche ainsi de diffuser dans le tampon d'électrophorèse lorsqu'ils sont déposés dans leurs puits. Le bleu de bromophénol marquera le front de migration.

Les échantillons solubilisés doivent contenir 1 à 20 μ g de protéines/25 μ l pour une résolution optimale des bandes protéiques par le bleu de Coomassie (en réalité, il faut au moins 1 μ g de protéines par bande). Pour pouvoir analyser la fraction endoPG purifiée et les protéines de surnageant de culture de *C. lindemuthianum*, il a fallu les concentrer. La concentration a été réalisée par le système Centricon 10 d'Amicon (Annexe III.1.).

Préparation des gels

Running Gel (12%) :

(composition pour 10 ml)

- Acrylamide (LKB) 30% +
Bisacrylamide (LKB) 0,8% : 4 ml
- Tris 1,5M-SDS (LKB) 0,4%
pH 8,8 : 2,5 ml
- H₂O_d : 3 ml
- TEMED (Merck) : 10 μ l
- Persulfate d'ammonium
(Merck) 1% : 0,5 ml

Stacking Gel (3%) :

(Composition pour 5 ml)

- Acrylamide (LKB) 30% +
Bisacrylamide (LKB) 0,8% : 0,5 ml
- Tris 0,5M-SDS (LKB) 0,4%
pH 8,8 : 1,25 ml
- H₂O_d : 2,75 ml
- TEMED (Merck) : 5 μ l
- Persulfate d'ammonium
(Merck) 1% : 0,5 ml

Après avoir ajouté les 2 catalyseurs (TEMED et persulfate d'ammonium) au mélange acrylamide-bisacrylamide, le running gel est coulé entre 2 plaques de verre séparées par des espaceurs de 0,75 mm d'épaisseur. On ajoute au dessus un peu d'iso-butanol pour éviter tout contact avec l'oxygène pendant la polymérisation du gel. Après 20 minutes environ, on élimine l'iso-butanol, on rince la surface du gel avec de l'eau désionisée, on place un peigne en téflon qui moulera des puits dans le stacking gel avant de couler ce dernier jusqu'au sommet des plaques de verre.

Migration

Les puits sont remplis avec au maximum 25 µl d'échantillon. Un puits au moins est rempli avec un échantillon comprenant des protéines de PM connus. La cuve à électrophorèse (Mini PROTEAN II Slab Cell - Bio Rad) est remplie de tampon puis mise sous tension à 200 V. On arrête l'électrophorèse quand le front de migration, marqué par le bleu de bromophénol, atteint l'extrémité anodique du gel.

Tampon d'électrophorèse :

- Tris 0,025 M
- Glycine 0,192 M
- SDS 0,1% pH 8,8

Marqueurs protéiques (Sigma) :

- α-Lactalbumine 14.200 daltons
- Inhibiteur de trypsine 20.100 daltons
- Trypsinogène 24.000 daltons
- Anhydrase carbonique 29.000 daltons
- Glyceraldéhyde-3-Phosphate
 Déshydrogénase 36.000 daltons
- Ovalbumine 45.000 daltons
- Albumine bovine 66.000 daltons

Détection des protéines

Après migration électrophorétique, le gel est retiré délicatement de son support de verre et plongé dans une solution de coloration à base de bleu de Coomassie. Ce dernier se fixe sur les protéines et les colore, mais il diffuse aussi dans tout le gel. Afin d'éliminer ce bruit de fond, on rince le gel dans un "décolorant".

Colorant : (proportions pour 100 ml)

- Bleu de Coomassie Brilliant Blue R250 (Merck) : 0,25 g
- Méthanol : 45 ml
- H₂O_d : 45 ml
- acide acétique : 10 ml

Décolorant : (proportions pour 100ml)

- Ethanol : 30 ml
- acide acétique : 10 ml
- H₂O_d : 60 ml

III.2.4. Mise en évidence des activités exoPG et endoPG via chromatographie sur couche mince de silice

C. lindemuthianum produit des endoPG, mais aussi des exoPG. L'endoPG attaque l'acide polygalacturonique en libérant des monomères, des dimères et des trimères de l'acide galacturonique; l'exoPG en libérant uniquement des monomères. Ceci peut être mis en évidence en séparant par chromatographie sur couche mince de silice (cfr. matériel et méthodes p. 17), les produits de dégradation enzymatique de l'exoPG et de l'endoPG, à partir de l'acide homopolygalacturonique. (fig.III.2. : pistes 4 et 5)

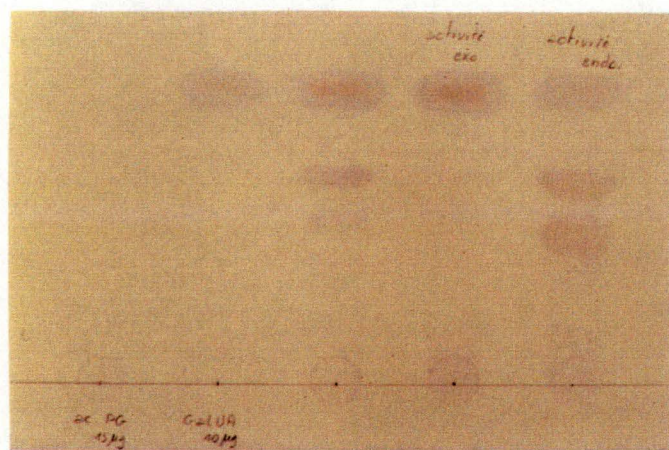


fig. III.2. : Mise en évidence des activités exo- et endo-PG

- piste 1 : acide homopolygalacturonique (Sigma) : 10 μ g
- piste 2 : acide galacturonique (Aldrich) : 10 μ g
- pistes 3, 4, 5 : produits de dégradation après 12 heures d'incubation à 30°C de 1 ml d'acide homopolygalacturonique (Sigma)/acétate 50 mM - pH 5,2 avec 100 μ l de fraction à activité PG dialysée contre du tampon acétate 50 mM - pH 5,2. 50 μ l ont été déposés par piste.
- piste 3 : incubation avec 100 μ l de PG d'un surnageant de culture.
- piste 4 : incubation avec 100 μ l de PG d'une fraction "contaminante" (fraction non retenue par la colonne de CM Séphadex C-50 dans les conditions initiales de force ionique).
- piste 5 : incubation avec 100 μ l d'endoPG purifiée.

Fraction	Activité PG spécifique	Vol.	Activité PG totale	Rendement	Sucres réducteurs	Protéines*	Type activité PG
	unités/ml	ml	unités	(%)	(μ éq/ml)	(μ g/ml)	
surnageant Sephadex CM 50	52	150	7800	100	20,1	71	exo + endo
	162	20	3240	42	0	27	endo

* mesuré après dialyse (cut-off 12.500)

tab. III.1. : Résumé de purification de l'endoPG

PM
(daltons)

66.000

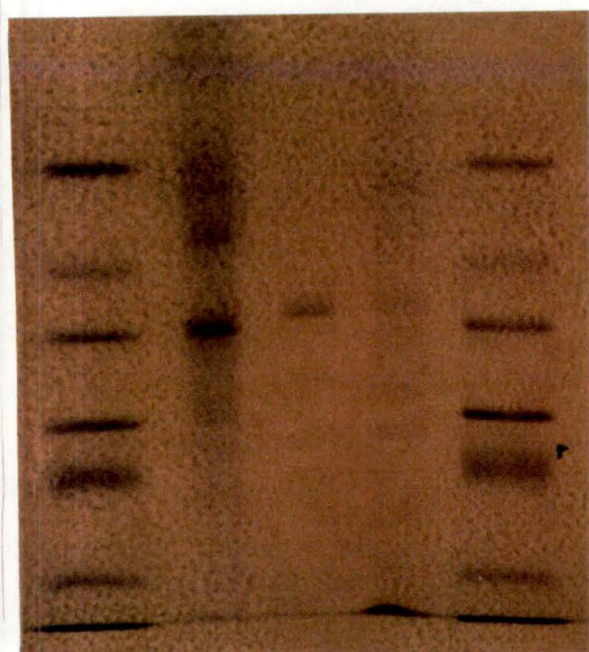
45.000

36.000

24.000

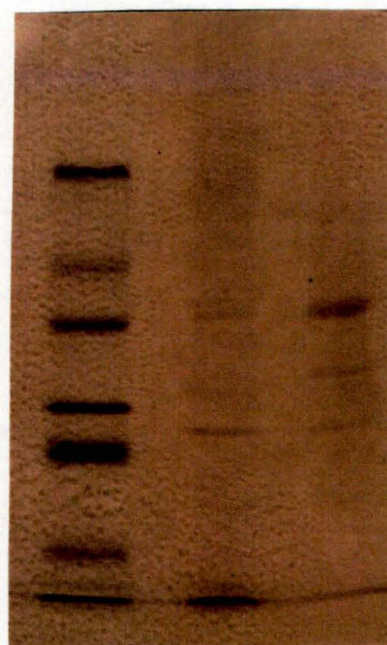
20.000

14.000



1 2 3 4 5

fig. III.3. : Electrophorèse SDS-PAGE 12%.
 -piste 1 et 5 : étalons PM (10 μ g protéines marqueurs, Sigma)
 -piste 2 : polygalacturonase commerciale (10 μ g polygalacturonase d'*Aspergillus niger*, Sigma)
 -piste 3 : endoPG purifiée (concentrée 25x)
 -piste 4 : surnageant de milieu de culture (concentré 25x)



1 2 3

fig. III.4. : Electrophorèse SDS-PAGE 12%.
 -piste 1 : étalons PM (10 μ g protéines marqueurs, Sigma)
 -piste 2 : surnageant de milieu de culture (concentré 40x)
 -piste 3 : endoPG purifiée (concentrée 40x)

III.3. Evaluation de la purification

Le tableau III.1. apprécie le rendement d'une purification.

L'activité PG spécifique augmente 9 fois après purification. Il faut cependant remarquer que cette valeur sous-estime l'augmentation d'activité endoPG spécifique puisque l'on a pris en compte l'activité exoPG du surnageant en plus de l'activité endoPG, lors du calcul. Il s'ensuit que le rendement de la purification de l'endoPG est supérieur à 42%.

L'électrophorèse sur gel de polyacrylamide 12% montre que l'on a purifié une protéine d'un PM de 37.000 daltons d'un surnageant pauvre en protéines qui laisse une faible traînée de protéines sur le gel. A côté de cela, on peut voir que l'endoPG purifiée est bien plus propre qu'une solution de polygalacturonase commerciale (Pectinase d'*Aspergillus niger*, Sigma). fig. III.3. L'endoPG purifiée n'est cependant pas de pureté totale puisque 2 petites bandes contaminantes de bas PM sont visibles en-dessous de celle correspondant à l'endoPG de 37.000 daltons. (fig. III.4.)

Enfin, la chromatographie sur couche mince (fig. III.2.) montre que l'on a bien isolé l'activité endoPG de l'activité PG (exoPG + endoPG) du surnageant.

III.4. Commentaire sur le protocole de purification

Le grand avantage du protocole de purification décrit dans ce travail est qu'il est très simple. Il est facile à mettre en oeuvre et demande peu de temps : en 24 heures, on peut isoler 4000 unités endoPG dans 25 ml de tampon acétate à partir de 200 ml de milieu de culture.

Le peu de temps requis pour une purification n'est pas seulement un avantage purement pratique. En effet, l'enzyme est relativement instable, même à 4°C (voir chap. IV.2.), et on a intérêt à l'isoler dans les plus brefs délais.

Le seul inconvénient est que l'enzyme n'est pas de pureté totale. L'électrophorèse montre la présence de 2 protéines contaminantes, en faibles quantités, qui ont un PM de 30.000 et 24.000 daltons environ. Quoique les PM ne soient pas fortement éloignés de celui de l'endoPG (37.000 daltons), on pourrait envisager de les séparer par chromatographie en tamis moléculaire, sur Séphadex G-75 par exemple. Malheureusement, cette alternative n'est pas réalisable, vu les volumes que l'on est obligé de traiter. En effet, toute concentration significative (supérieure à 10X) d'une solution de PG de *C. lindemuthianum* se traduit par une perte considérable d'activité. Que ce soit

par précipitation au sulfate d'ammonium, lyophilisation ou ultrafiltration (Amicon CH2A Hollow Fiber Ultrafiltration System), on a constaté une perte très importante d'activité PG. De toute façon, ces contaminants ne sont pas gênants dans la mesure où l'objectif principal de la purification est atteint : on s'est débarrassé de l'activité exoPG qui interfère avec l'activité endoPG.

IV. Caractérisation de l'endopolygalacturonase de *C. lindemuthianum*.

IV.1. Résumé

Quelques caractéristiques de l'endoPG purifiée de *C. lindemuthianum* (β) ont été déterminées.

L'enzyme est une glycoprotéine qui a un poids moléculaire de 37.000 daltons et un pH_i de 6,5. L'activité enzymatique est optimale à 50°C et à pH 5,5. Elle possède un $K_M = 0,11$ (%) sur acide homopolygalacturonique (Sigma). Enfin, l'enzyme est relativement instable : stockée à 4°C, elle perd plus de la moitié de son activité initiale après 1 mois.

IV.2. Stabilité de l'enzyme à 4°C

Quatre ml d'endoPG purifiée ont été conservés à 4°C dans un tube fermé. L'activité PG de cette solution enzymatique a été dosée plusieurs fois pendant un mois. Les dosages ont été effectués comme décrit dans les matériel et méthodes en p.16 sauf que l'incubation du substrat s'est faite seulement avec 50 μ l d'enzyme et pendant 15 minutes. La fig. IV. 1. montre comment diminue l'activité endoPG pour des dosages réalisés plusieurs jours après la purification.

nbre. de jours après purification	Activité endoPG (Δ Abs./15min.)	
0	0,250	0,253
1	0,236	0,235
2	0,205	0,229
3	0,216	0,212
5	0,184	0,181
10	0,121	0,127
16	0,125	0,125
32	0,085	0,099

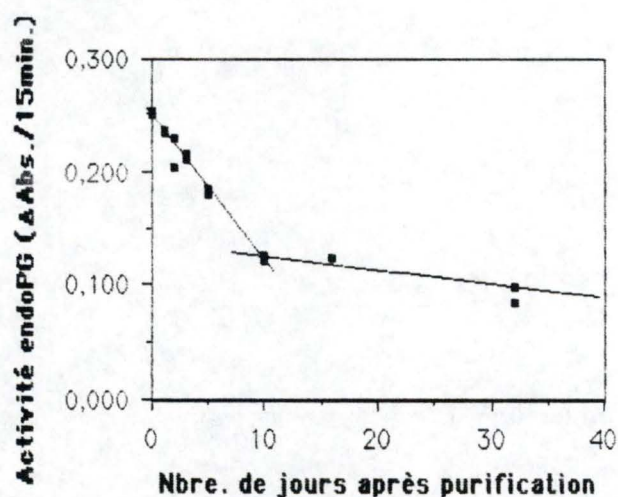


fig.IV.1. : Stabilité de l'endoPG à 4°C

Ces résultats montrent que l'endoPG est instable : après 1 mois, on perd plus de la moitié de l'activité de départ.

L'allure bimodale de la courbe suggère l'existence de 2 populations d'endoPG. Il pourrait s'agir d'une population d'endoPG glycosylée, plus stable, et d'une population non glycosylée, moins stable. (cfr. IV.7. Mise en évidence du caractère glycosylé de l'endoPG)

remarques :

- (1) L'ajout de différentes concentrations en EDTA ou SAB n'améliore pas de façon significative la stabilité de l'enzyme à 4°C (chiffres non présentés).
- (2) Des pertes importantes d'activité ont également été observées après congélation à -18°C (plus de 25% d'activité perdue après 1 jour au congélateur).

Annexe IV.1. : Température optimale d'activité de quelques endoPG

origine	auteurs	T° optimale (°C)
<i>Kluyveromyces fragilis</i>	Lim <i>et al.</i> , 1980 [31]	50
<i>Aspergillus niger</i>	Heinrichova et Dzurcova, 1981 [32]	40
<i>Aspergillus satoii</i>	Yamasaki <i>et al.</i> , 1966 [33]	45
<i>Coniophora diplodiella</i>	Endo, 1964 [34]	50

IV.3. Recherche de la température optimale d'activité

Afin de déterminer la température optimale d'activité enzymatique, plusieurs dosages d'activité endoPG ont été réalisés à des températures comprises entre 4 et 80°C. Les dosages ont été effectués comme décrit dans les matériel et méthode en p.16 sauf que l'incubation du substrat s'est faite seulement avec 50 µl d'enzyme et pendant 15 minutes.

Les résultats obtenus sont présentés en fig.IV.2. .

température (°C)	Activité endoPG (ΔAbs./15min.)	
4	0,008	0,014
10	0,032	0,032
20	0,081	0,094
30	0,151	0,159
40	0,236	0,235
50	0,256	0,261
60	0,125	0,106
70	0,000	0,000
80	0,000	0,000

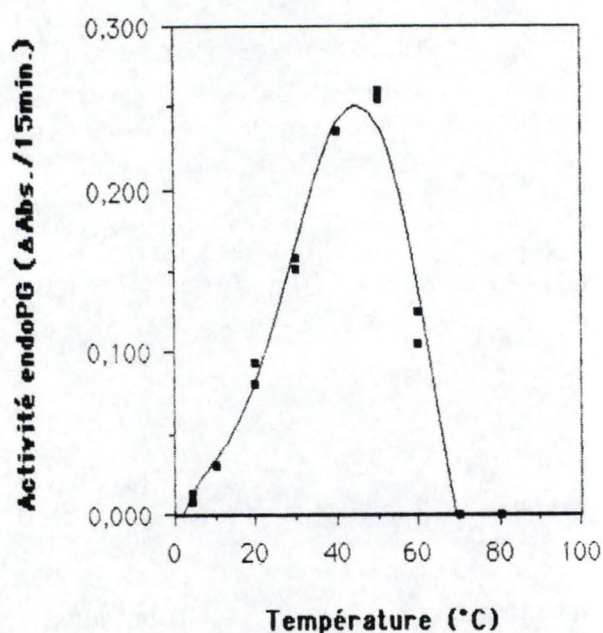


fig.IV.2. : température et activité enzymatique

On trouve un optimum thermique relativement élevé de $50 \pm 5^\circ\text{C}$. C'est une valeur courante pour les endoPG. (annexe IV.1.) A partir de 70°C, l'endoPG perd ses propriétés catalytiques.

IV.4. Détermination du pH optimum d'activité

Afin de déterminer le pH optimum d'activité enzymatique, plusieurs dosages d'activité endoPG ont été réalisés dans des tampons ayant des pH de 4 à 8.

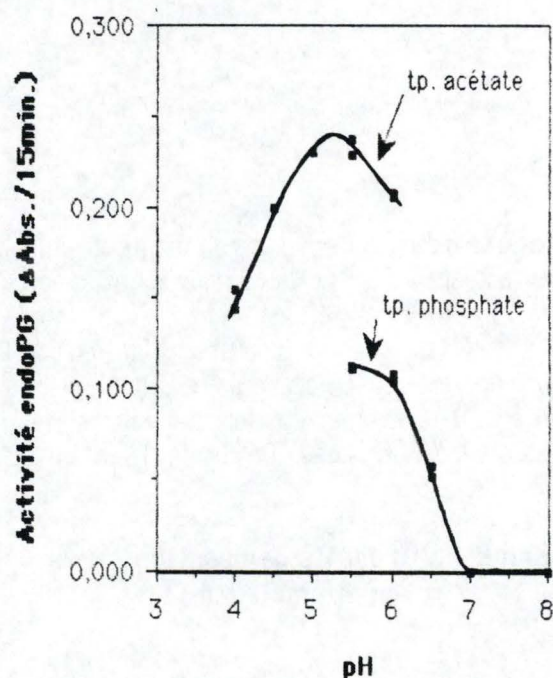
Annexe IV.2. : pH optimum de quelques endoPG

origine	auteurs	pH optimum
tomate	Markovic et Slezarik, 1977 [49]	4,5
banane	Markovic <i>et al.</i> , 1975 [35]	4,6
<i>Kluyveromyces fragilis</i>	Lim <i>et al.</i> , 1980 [31]	4-5
<i>Erwinia carotovora</i>	Nasuno et Starr, 1966 [36]	5,3
<i>Aspergillus niger</i>	Heinrichova et Dzurova, 1981 [32]	4,9
<i>Aspergillus satoii</i>	Yamasaki <i>et al.</i> , 1966 [33]	4,9
<i>Colletotrichum lindemuthianum</i>	English <i>et al.</i> , 1972 [12]	5
<i>Coniophora diplodiella</i>	Endo, 1964 [34]	4-4,5
<i>Fusarium oxysporum</i>	Strand <i>et al.</i> , 1976 [37]	5
<i>Rhizopus stolonifer</i>	Lee et West, 1981 [38]	4,9

Deux tampons ont été utilisés pour couvrir cette gamme de pH : un tampon acétate et un tampon phosphate. Les dosages d'activité ont été effectués comme décrit dans les matériel et méthode en p.16 sauf que l'incubation du substrat se fait seulement avec 50 μ l d'enzyme et pendant 15 minutes.

Les résultats obtenus sont présentés en fig.IV.3.

	pH	Activité endoPG (Δ Abs./15min.)	
tp. acétate (50mM)	4.0	0,155	0,145
	4,5	0,200	0,200
	5,0	0,231	0,230
	5,5	0,229	0,238
	6,0	0,206	0,208
tp. PO_4^{3-} (50mM)	5,5	0,113	0,114
	6,0	0,109	0,105
	6,5	0,051	0,057
	7,0	0,000	0,000
	8,0	0,000	0,000



N.B. : Aux environ de pH 3,5 l'acide polygalacturonique n'est plus soluble. Aussi n'avons-nous pas effectué de mesures à des pH inférieurs à 4.

fig.IV.3. : pH et activité enzymatique

Ces résultats montrent d'une part que les propriétés catalytiques de l'endoPG sont meilleures dans le tampon acétate et d'autre part que le pH optimum d'activité se situe entre 5,0 et 5,5. A partir de pH 7, l'activité enzymatique est absente. On peut proposer une hypothèse simple quant à sa disparition. Le pH_i de l'enzyme est de 6,5 (chap. IV.8. : Détermination du pH_i de l'endoPG).

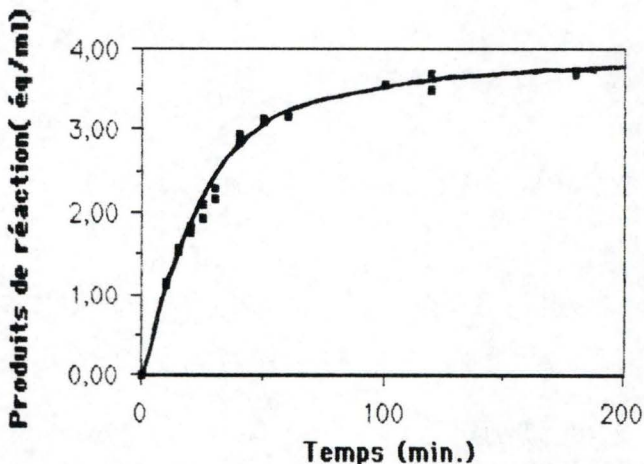
Ceci signifie qu'au delà de ce pH, l'enzyme se charge négativement. Or son substrat, l'acide polygalacturonique, est lui aussi chargé négativement à ces pH. Dans ces conditions, on comprend que l'enzyme n'ait plus aucune affinité pour son substrat.

Quand on compare avec les pH optimum d'autres endoPG (annexe IV.2.), on constate qu'il s'agit d'une valeur normale. Un pH faiblement acide semble être le pH idéal pour ce groupe d'enzymes.

Annexe IV.3. : Recherche du temps optimum pour un dosage d'activité enzymatique (la réaction s'effectuant à 30°C, pH 5,2 pour 5 unités endoPG par ml d'acide homopolygalacturonique 0,1%).

200 unités endoPG (environ 2ml d'endoPG purifiée) sont incubées avec 40ml d'acide homopolygalacturonique/acétate 50mM-pH 5,2 dans un erlenmeyer en bain-marie à 30°C. Après différents temps d'incubation, des volumes de 1ml sont prélevés et les produits de réaction (groupes réducteurs) sont dosés. On obtient les résultats suivants :

Temps (min.)	Produits de réaction (micro-éq/ml)	
0	0	0
10	1,12	1,14
15	1,56	1,53
20	1,84	1,77
25	1,93	2,09
30	2,17	2,31
40	2,85	2,94
50	3,14	3,13
60	3,19	3,18
100	3,58	3,59
120	3,70	3,51
180	3,72	3,73



Les produits de catalyse enzymatique s'accumulent toujours plus lentement avec le temps parce que le substrat est progressivement hydrolysé et devient ainsi de moins en moins disponible. Au-delà de 1 heure, l'accumulation des produits devient négligeable et le dosage d'activité endoPG est exclu. Des temps compris entre 10 et 40 minutes conviennent pour doser l'activité enzymatique.

Des temps d'incubation courts (10, 15 ou 20 minutes, par exemple) sont des temps pour lesquels l'enzyme fonctionne avec une bonne efficacité. Pour des temps plus longs (30, 40 minutes, par exemple), l'efficacité est moindre. En outre, des temps d'incubation élevés permettent un dosage plus précis : l'erreur relative commise sur une mesure sera moins importante. Il faut donc trouver un compromis entre efficacité enzymatique et précision des mesures. Pour l'étude cinétique de l'endoPG, nous avons choisi un temps d'incubation de 30 minutes.

IV.5. Cinétique enzymatique : recherche du K_m

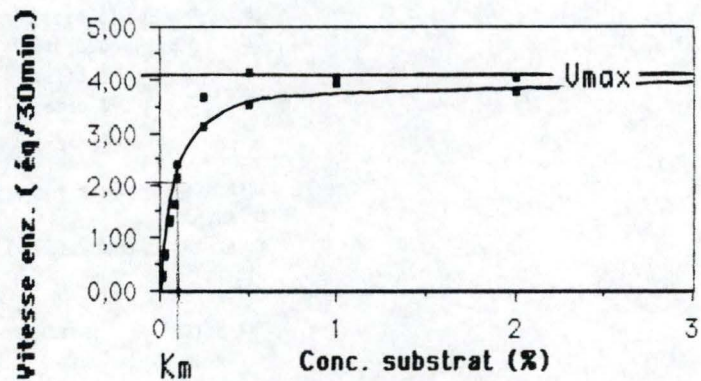
Pour tracer la courbe de vitesse enzymatique en fonction de la concentration en substrat, et ainsi déterminer la constante de Michaelis-Menten (K_m), on a dosé les produits d'hydrolyse enzymatique. Ces dosages ont été effectués dans des conditions déterminées :

- le substrat est l'acide homopolygalacturonique (Sigma) pour lequel on a trouvé un degré de polymérisation moyen $DP = 15$ (cette valeur a été obtenue en comparant le pouvoir réducteur de l'acide homopolygalacturonique avec celui de l'acide galacturonique, par 2 méthodes différentes).
- 5 unités endoPG sont incubées par ml de substrat de concentration donnée.
- une température d'incubation de $30^\circ C$.
- un pH d'incubation de 5,2 (pH optimum d'activité).
- un temps de réaction enzymatique de 30 minutes. (annexe IV.1.)

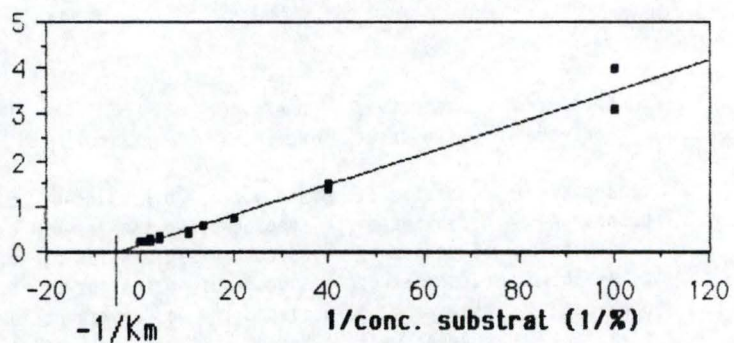
L'augmentation du nombre de groupes réducteurs en 30 minutes donne la vitesse enzymatique.

Les résultats suivant ont été obtenus :

Conc. substrat (%)	vitesse enz. ($\mu eq/30min.$)	
0,010	0,25	0,32
0,025	0,67	0,71
0,050	1,35	1,33
0,075	1,65	1,65
0,100	2,15	2,41
0,250	3,71	3,15
0,500	3,52	4,16
1,000	4,05	3,95
2,000	3,81	4,03



1/vitesse enz.
(micro-ég/ml)



N.B. : Toutes les solutions à doser auxquelles on a ajouté le DNS ont été filtrées sur filtre Millipore $1,6\mu m$ avant de les passer au spectrophotomètre parce que, à concentration élevée, les pectines créent un trouble -un précipité- qui empêche toute lecture correcte de l'absorbance.

fig. IV.4. : concentration en substrat et vitesse enzymatique (Courbe Michaëlis-Menten)

Annexe IV.4. Recherche du KM par ajustement de l'équation de Michaelis-Menten aux valeurs expérimentales. (quelques paragraphes du listing BMDP 3R)

BMDP3R - NONLINEAR REGRESSION

Copyright 1977, 1979, 1981, 1982, 1983, 1985, 1987, 1988

BMDP Statistical Software, Inc.

BMDP Statistical Software, Inc. | Statistical Software, Ltd.
 1440 Sepulveda Blvd | Cork Technology Park, Model Farm Rd
 Los Angeles, CA 90025 USA | Cork, Ireland
 |
 Phone (213) 479-7799 | Phone +353 21 542722
 Fax (213) 312-0161 | Fax +353 21 542822
 Telex 4972934 BMDP UI | Telex 75659 SSWL EI

Version: 1988 (VAX/VMS)

Manual: BMDP Manual Vol. 1 (August, 1988); Vol. 2 (December, 1988).

Use 1983 or 1985 edition until 1988 becomes available.

```

/problem title is 'cinetique endoPG'.
/input file = 'endopg.dat'.
  variables = 2.
  cases = 18.
  format = free.
/variables names = conc,activite.
/regress dependent = activite.
  independent = conc.
  parameters = 2.
/fun f = (p1*conc)/(p2+conc).
/parameters initial = 1, .200.
/plot residual.
  variable = conc.
  normal.
  size = 20,15.
/end.
    
```

ITERATION NO.	HALVING	RESIDUAL SUM OF SQ	P1 = V_{max}	P2 = K_M
0	0	1.36762	1.00000	0.20000
1	0	0.02408	0.41048	0.13609
2	0	0.01289	0.43037	0.10605
3	0	0.01252	0.43507	0.11532
4	0	0.01252	0.43405	0.11426
5	0	0.01252	0.43418	0.11443
6	0	0.01252	0.43416	0.11441
7	0	0.01252	0.43416	0.11441
8	0	0.01252	0.43416	0.11441
9	0	0.01252	0.43416	0.11441

ITERATION 9 HAS THE SMALLEST RESIDUAL SUM OF SQUARES (SUBJECT TO CONSTRAINTS, IF ANY).
 REMAINING CALCULATIONS ARE BASED ON THE RESULTS OF THIS ITERATION.

PARAMETER	ESTIMATE	ASYMPTOTIC STANDARD DEVIATION	TOLERANCE
P1 = V_{max}	0.434163	0.016240	0.4444038853
P2 = K_M	0.114411	0.015006	0.4444038853

CASE NO. LABEL	PREDICTED activite	STD DEV OF PRED VALUE	OBSERVED activite	COOK DISTANCE	WEIGHT * DIAG HAT MAT	STANDARDIZED RESIDUAL	conc	
1	0.348976E-01	0.335118E-02	0.110000E-01	-0.238976E-01	0.539049E-02	0.143514E-01	-0.860484	0.100000E-01
2	0.348976E-01	0.335118E-02	0.180000E-01	-0.168976E-01	0.269507E-02	0.143514E-01	-0.608434	0.100000E-01
3	0.778570E-01	0.650606E-02	0.530000E-01	-0.248570E-01	0.238672E-01	0.540922E-01	-0.913635	0.250000E-01
4	0.778570E-01	0.650606E-02	0.570000E-01	-0.208570E-01	0.168038E-01	0.540922E-01	-0.766613	0.250000E-01
5	0.132036	0.899405E-02	0.122000	-0.100363E-01	0.827567E-02	0.103373	-0.378894	0.500000E-01
6	0.132036	0.899405E-02	0.120000	-0.120363E-01	0.119026E-01	0.103373	-0.454399	0.500000E-01
7	0.171914	0.981249E-02	0.152000	-0.199136E-01	0.405386E-01	0.123043	-0.760169	0.750000E-01
8	0.171914	0.981249E-02	0.152000	-0.199136E-01	0.405386E-01	0.123043	-0.760169	0.750000E-01
9	0.202492	0.990901E-02	0.202000	-0.491577E-03	0.253318E-04	0.125476	-0.187912E-01	0.100000
10	0.202492	0.990901E-02	0.229000	0.265084E-01	0.736633E-01	0.125476	1.01332	0.100000
11	0.297853	0.841726E-02	0.360000	0.621468E-01	0.270134	0.905398E-01	2.32957	0.250000
12	0.297853	0.841726E-02	0.303000	0.514683E-02	0.185276E-02	0.905398E-01	0.192929	0.250000
13	0.353317	0.889457E-02	0.341000	-0.123170E-01	0.121284E-01	0.101099	-0.464407	0.500000
14	0.353317	0.889457E-02	0.406000	0.526830E-01	0.221888	0.101099	1.98639	0.500000
15	0.389590	0.112214E-01	0.394000	0.440982E-02	0.283981E-02	0.160913	0.172094	1.00000
16	0.389590	0.112214E-01	0.384000	-0.559017E-02	0.456350E-02	0.160913	-0.218158	1.00000
17	0.410671	0.133312E-01	0.370000	-0.406709E-01	0.401829	0.227112	-1.65377	2.00000
18	0.410671	0.133312E-01	0.392000	-0.186709E-01	0.846845E-01	0.227112	-0.759199	2.00000

En ajustant ces valeurs expérimentales, par régression non linéaire, à l'équation de Michaélis-Menten on obtient un $K_M = 0,11$ (annexe IV.4.). Cette valeur peut être comparée à celles trouvées par d'autres auteurs pour différentes endoPG. (annexe IV.5.)

Annexe IV.5. : K_M de quelques endoPG

origine	substrat	K_M (‰)	auteurs
tomate	ac. polygalacturonique (DP = 187)	0,04	Markovic et Slezarik, 1977 [47]
<i>Aspergillus niger</i>	ac. polygalacturonique (DP = 44)	0,04	Thibault et Mercier, 1979 [48]
	ac. polygalacturonique (DP = 153)	0,02	Heinrichova et Dzurova, 1981 [32]
	ac. hexagalacturonique	0,07	
	ac. pentagalacturonique	0,08	
	ac. tétragalacturonique	0,13	
<i>Erwinia carotovora</i>	ac. polygalacturonique	0,15	Nasuno et Starr, 1966 [36]
<i>Rhizopus stolonifer</i>	ac. polygalacturonique (DP = 60)	0,07	Lee et West, 1981 [38]

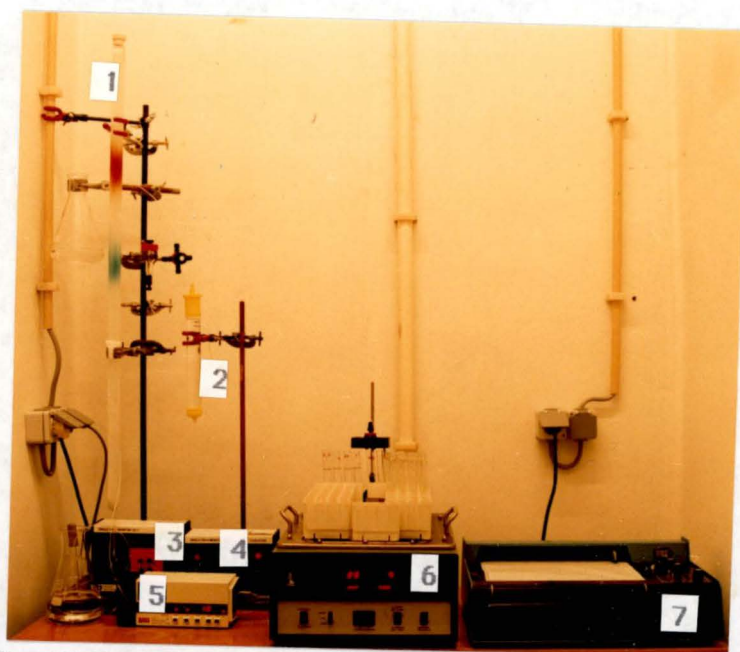


fig. IV.5. : Matériel de chromatographie

1. colonne Sephadex G-75 (Pharmacia)
2. colonne CM-Sephadex C-50 (Pharmacia)
3. détecteur UV (Single path monitor UV-1 - Optical unit, Analis)
4. amplificateur (Single path monitor UV-1 - Control unit, Analis)
5. pompe péristaltique (2132 Microperpex, LKB)
6. collecteur de fraction (ISCO)
7. enregistreur (LKB)

IV. Recherche du poids moléculaire

Le poids moléculaire d'une protéine donnée peut être déterminé par chromatographie en tamis moléculaire. (fig. IV.5.) A l'aide d'une colonne (2,10 X 87 cm, soit un volume total de gel $V_t = 300$ ml) de Sephadex G-75 (Pharmacia) calibrée, nous avons trouvé un PM de 36.000 daltons pour l'endoPG de *C. lindemuthianum*.

Calibration

Le volume mort (V_0) de la colonne a été donné par le volume d'élution du bleu dextran : 5 ml de bleu dextran (Pharmacia) 0,2% ont été appliqués sur la colonne et élués à une vitesse de $7 \text{ ml.cm}^{-2}.\text{h}^{-1}$ par du tampon acétate 50 mM - pH 5,2. On a trouvé une valeur $V_0 = 95$ ml.

La calibration proprement dite a été réalisée de la même manière avec 5 ml d'un mélange SAB (Sigma) 1,5% - Ovalbumine (Sigma) 1% - Cytochrome C (Sigma) 0,5%. On a noté les volumes d'élution suivants :

	PM (daltons)	V_e (ml)	$K_{av} = (V_e - V_0)/(V_t - V_0)$
SAB	67.000	107	0,06
Ovalbumine	42.000	125	0,15
Cytochrome C	12.400	193	0,48

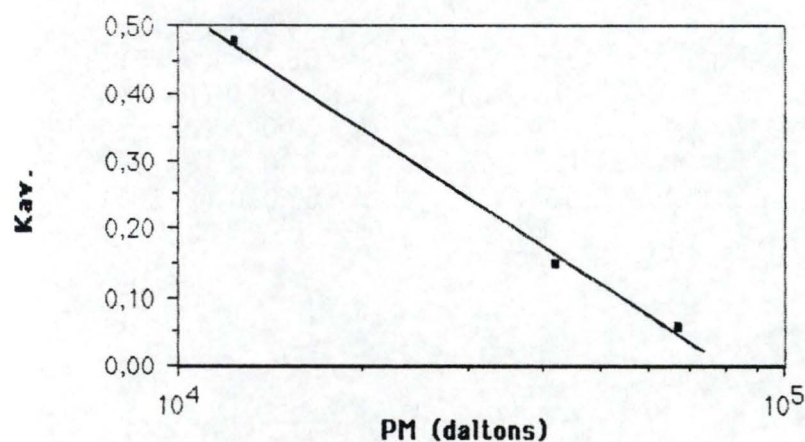


fig. IV.6. : Calibration de la colonne de Sephadex G-75

Annexe IV.6. : Poids moléculaire de quelques endoPG

origine	auteurs	PM (méthode)
tomate	Pressey et Avants, 1973 [44]	84.000 (G-100)
		44.000 (G-100)
<i>Aspergillus niger</i>	Cooke <i>et al.</i> , 1976 [45]	35.000 (G-75)
	Fisher <i>et al.</i> , 1973 [46]	31.000 (P-150)
<i>Fusarium oxysporum</i>	Strand <i>et al.</i> , 1976 [37]	37.000 (ultracentrifugation)
<i>Colletotrichum</i>	Barthe <i>et al.</i> , 1981 [47]	37.000 (G-100)
<i>lindemuthianum</i>	English <i>et al.</i> , 1972 [12]	62.000 (P-300)

Détermination du PM

10 ml d'endoPG purifiée ont été appliqués sur la colonne préalablement rincée et équilibrée dans un tampon acétate 50 mM - pH 5,2. L'éluion a été réalisée avec un débit de $7 \text{ ml.cm}^{-2}.\text{h}^{-1}$ et l'activité endoPG a été suivie en sortie de colonne. Le dosage de l'activité a été réalisé comme décrit dans les matériels et méthodes en p.16 sauf que l'incubation du substrat s'est faite seulement avec $50 \mu\text{l}$ d'enzyme et pendant 15 min..

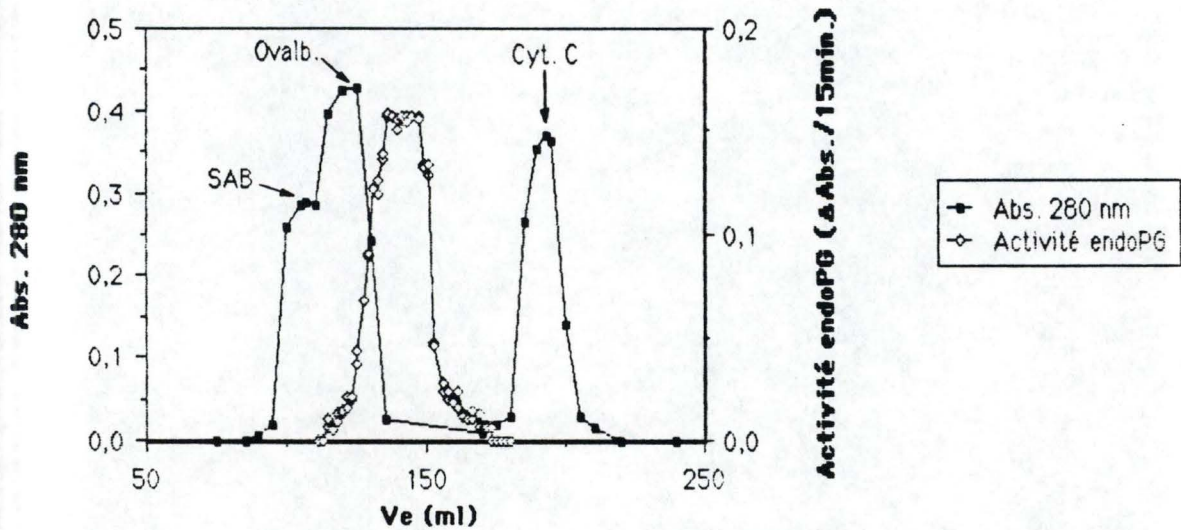


fig. IV.7. : profil de chromatographie sur Sephadex G-75

L'élution de l'endoPG atteint son maximum dès 136 ml. Nous considérons donc le volume d'élution de l'endoPG, $V_e \text{ endoPG} = 136 \text{ ml}$. Cette valeur correspond à un K_{av} de 0,20, ou encore, à un PM de 36.000 daltons.

Comme la littérature [13] mentionne un PM de 37.000 daltons et comme l'électrophorèse SDS-PAGE précédente montre également un PM de 37.000 daltons pour l'endoPG, nous tenons cette valeur pour plus exacte.

On trouve en annexe IV.6. les PM d'autres endoPG.

IV.7. Mise en évidence du caractère glycosylé de l'endoPG

La glycosylation de l'endoPG a été démontrée par le fait qu'elle se lie à la concanavaline A.

ConA-Sepharose

La ConA-Sepharose (Pharmacia) est composée de concanavaline A (ConA) couplée à du Sepharose 4B.

La concanavaline A se combine à des molécules qui comportent des résidus α -D-mannopyranosyl, α -D-glucopyranosyl et à des produits de structure stérique voisine. Pour réagir avec la ConA, le sucre qui se combine doit comporter des groupes hydroxylés en C-3, C-4 et C-6. [30]

Mise en évidence de la glycosylation

10ml d'endoPG purifiée (environ 300 μ g) ont été dialysés contre un tampon acétate 50 mM - pH 5,2, NaCl 1 M, CaCl₂ 1 mM, MnCl₂ 1 mM, MgCl₂ 1 mM avant d'être appliqués sur une colonne (8 ml) de ConA-Sepharose 4B équilibrée préalablement par le même tampon. La présence simultanée d'ions Mn²⁺ et Ca²⁺ est indispensable si l'on veut maintenir le pouvoir de combinaison de la molécule de concanavaline A à pH 5,2. [39]

Un rinçage a été réalisé avec 10 ml de tampon. L'éluion des produits fixés a été assurée par une solution d' α -D-méthylmannoside tamponnée (comme proposé dans le manuel "Affinity chromatography : principes & methods" de Pharmacia) : 15 ml de tampon acétate 50 mM-pH 5,2, NaCl 1 M, CaCl₂ 1 mM, MnCl₂ 1 mM, MgCl₂ 1 mM et α -D-méthylmannoside 0,5 M.

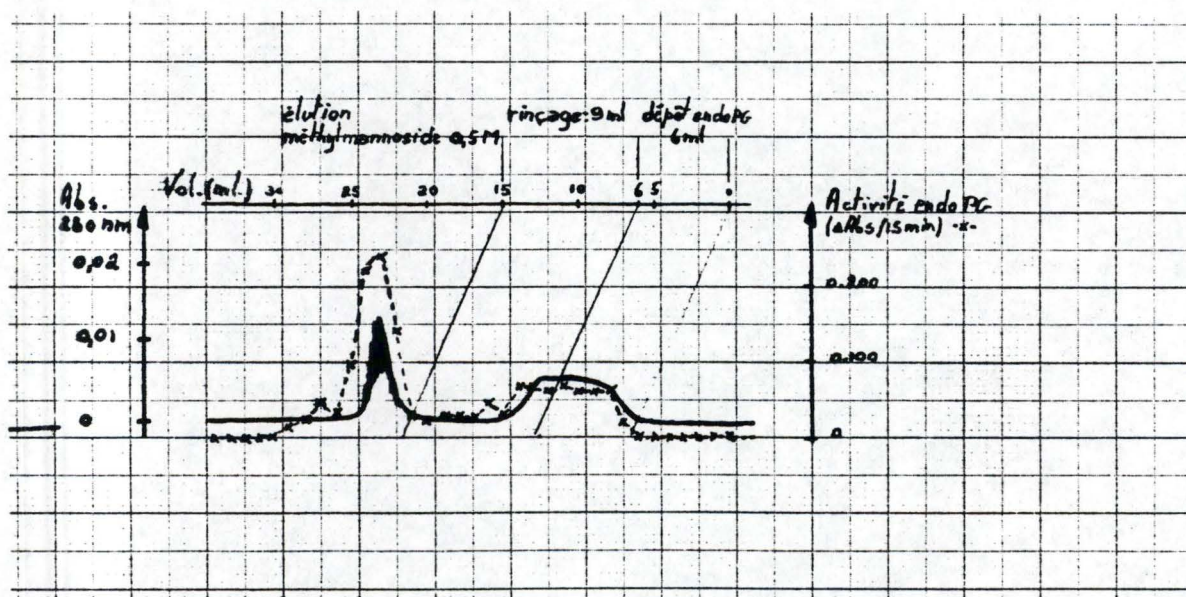


fig. IV.8. : profil de chromatographie sur ConA-Sepharose

Discussion

Le profil de chromatographie montre qu'une bonne partie de l'activité enzymatique a été retenue par la colonne de ConA-Sepharose. Cependant, une partie non négligeable passe, sans être retenue, lors du dépôt de l'endoPG et lors du rinçage. Il ne s'agit pas ici d'une déficience de capacité du gel. Une telle colonne a une capacité élevée (8,5 mg de thyroglobuline porcine/mi de gel, par exemple -donnée fournie par Pharmacia Fine Chemicals [39]); 300 µg d'endoPG ne peuvent la saturer. En conséquent, nous pouvons interpréter ces résultats de 2 façons :

- soit on a à faire à 2 populations d'endoPG : 1 population étant glycosylée et l'autre ne l'étant pas; ce qui est possible vu l'allure bimodale de la courbe de stabilité de l'enzyme à 4°C (cfr. IV.2. Stabilité de l'endoPG à 4°C).
- soit l'endoPG est une protéine peu glycosylée qui ne se lie que faiblement aux molécules de concanavaleine A. Vu les résultats de l'électrophorèse SDS-PAGE 12% (fig. III.3. et III.4.), cette deuxième hypothèse semble probable. En effet, la bande protéique correspondant à l'endoPG n'est pas perturbée comme c'est généralement le cas des protéines fortement glycosylées : la bande protéique n'est pas retardée et ne laisse aucune trainée derrière elle.

IV.8. Recherche du pH_i

Le pH_i de l'endoPG de *C. lindemuthianum* (β) a été déterminé par électrofocalisation (isoelectric focusing ou IEF), une technique qui permet d'isoler les protéines selon leur pH_i .

Electrofocalisation : principe

L'électrofocalisation est une technique électrophorétique particulière. Les protéines, sous l'influence d'un champ électrique, migrent dans un gel à gradient de pH. Au fur et à mesure de leur migration, le pH du gel modifie leur charge électrique. Quand celle-ci devient nulle, c-à-d. quand les protéines se trouvent sous leur pH_i , la migration cesse. Les protéines déposées sur le gel IEF migrent et finissent donc par s'équilibrer à leur pH_i . Le gradient de pH dans le gel est réalisé par un mélange de polyampholytes (ayant des pH_i différents) de petit PM, appelés ampholines. Celles-ci, sous l'influence du champs électrique entre l'anode et la cathode migrent rapidement jusqu'à leur pH_i et produisent ainsi localement un pH déterminé. Les ampholytes les plus acides se concentrant vers l'anode et les plus basiques vers la cathode établissent un gradient de pH.

Préparation du gel IEF

L'électrofocalisation a été réalisée sur gel plat (115 x 230 x 1 mm) de polyacrylamide. Celui-ci a été préparé et coulé comme décrit dans le manuel "Isoelectric Focusing - principes & methods (1982)" de Pharmacia Fine Chemicals. [40]

La composition du gel est la suivante : (composition pour 30 ml)

-Acrylamide (LKB) 30% - Bisacrylamide (LKB) 1,6%	4,5 ml
-Ampholines (Pharmacia) : Pharmalyte 5-8	3 ml
Pharmalyte 6,5-9	0,3 ml
Pharmalyte 3-10	0,8 ml
-Urée (LKB)	3 ml
-H ₂ O _d	(porter jusqu'à 30 ml)
-Persulfate d'ammonium (Merck) 30%	80 µl
-TEMED (Merck)	30 µl

Après 90min. de polymérisation, le gel a été extrait de son moule et a été posé délicatement sur la plaque de l'appareil à électrofocalisation (2117 MULTIPHOR II - Electrophoresis Unit, LKB).

Focalisation

Les bandes d'électrodes, préalablement équilibrées dans leur tampon d'électrofocalisation ont été appliquées en haut et en bas du gel.

tampon d'électrofocalisation :

- pour l'anode : acide glutamique 0,2 M (Janssen)
- pour la cathode : histidine 0,04 M (Merck)

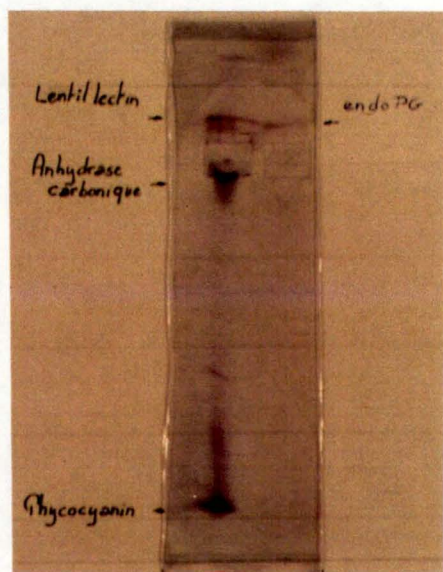
On a ensuite déposé les échantillons dans leurs puits. Un puits a été rempli avec 15 µl d'endoPG purifiée et concentrée 40 fois, et un autre avec 10 µl d'un mélange de protéines marqueurs qui ont permis d'apprécier la qualité de l'électrofocalisation.

On a ajusté une différence de potentiel de 500 V pendant 3 h pour permettre la pénétration des échantillons dans la profondeur du gel, avant de passer à 700 V pendant une nuit. L'électrofocalisation a été réalisée à 25°C.

Mesure du pH

Immédiatement après focalisation, une bande de gel de 1 cm de largeur a été écartée et coupée, avec précision, en petits segments de 0,5 cm. Ceux-ci ont été plongés séparément dans des cupules contenant 2ml d'eau désionisée.

Dans ces conditions, le pH de l'eau prend le pH du gel.



1 2

fig. IV.9. : Gel IEF
-piste 1 : contrôle
-piste 2 : endoPG purifiée

Détection des protéines

Après l'électrofocalisation, le gel a été plongé dans une solution de colorant à base de bleu de Coomassie, puis dans plusieurs bains de lavage (décolorant) pour éliminer l'excédent de colorant qui n'a pas été fixé sur les protéines.

colorant : (composition pour 250 ml)

-iso-propanol	: 67,5 ml
-acide acétique	: 25 ml
-Bleu de Coomassie Brilliant Blue R250 (Merck)	: 0,1 g
-Crocein Scarlet (Sigma)	: 0,125 g
-CuSO ₄ (Fluka)	: 1,25 g
-H ₂ O _d	: 157,5 ml

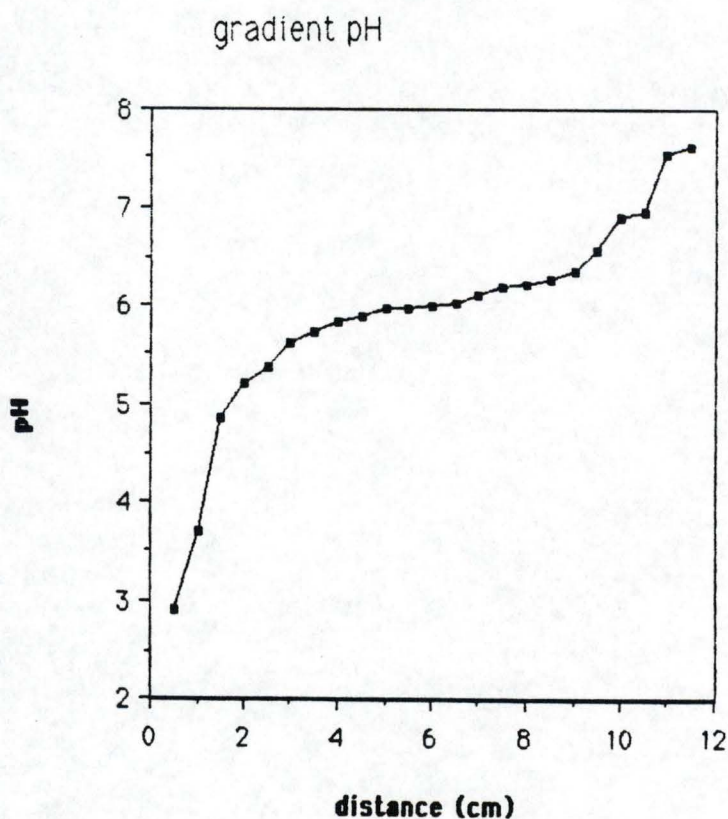
décolorant : (composition pour 250 ml)

-iso-propanol	: 30 ml
-acide acétique	: 17,5 ml
-CuSO ₄	: 1,25 g
-H ₂ O _d	: 202,5 ml

Résultats

fig. IV.9

distance (cm)	pH
0,5	2,91
1	3,69
1,5	4,87
2	5,21
2,5	5,39
3	5,61
3,5	5,72
4	5,84
4,5	5,89
5	5,97
5,5	5,97
6	5,99
6,5	6,04
7	6,11
7,5	6,18
8	6,22
8,5	6,27
9	6,34
9,5	6,58
10	6,91
10,5	6,96
11	7,53
11,5	7,62



Dans les conditions expérimentales décrites ci-dessus, nous obtenons pour l'endoPG de *C. lindemuthianum* (β) un $pH_i = 6,5$
 Les pH_i d'autres endoPG sont données en annexe IV.7..

Annexe IV.7. : pH_i de quelques endoPG

origine	auteurs	pH_i
<i>Aspergillus niger</i>	Koller et Neukom, 1969 [43]	4,5
<i>Coniothyrium diplodiella</i>	Endo, 1964 [34]	7,6
<i>Fusarium oxysporum</i>	Strand <i>et al.</i> , 1976 [37]	7
<i>Kluyveromyces fragilis</i>	Lim <i>et al.</i> , 1980 [31]	5,8 - 6,1

IV.9. Activité enzymatique sur gel pectate-calcium

Le substrat de l'endoPG est l'acide polygalacturonique. En présence de calcium, les chaînes homopolygalacturonates s'associent pour former un gel (cfr. introduction).

Nous avons dosé l'activité endoPG dans une solution de pectate-sodium et dans un gel pectate-calcium. L'endoPG s'est avérée incapable d'hydrolyser le gel pectate-calcium (acide homopolygalacturonique 0,1% + Ca^{2+} 150 mM / acétate 50 mM - pH 5,2).

Le site actif de l'endoPG ne reconnaît vraisemblablement pas les chaînes pectates sous leur conformation gel.

V. Production d'un sérum anti-endopolygalacturonase de *Colletotrichum lindemuthianum* (β)

V.1. Résumé

Un sérum anti-endoPG et un sérum dirigé contre l'ensemble des protéines d'un surnageant de culture de *C. lindemuthianum* (β) ont été produits par immunisation de lapins avec, respectivement, 300 et 500 μ g d'antigène. Ces 2 sérums qui reconnaissent les Ag exocellulaires de *C. lindemuthianum* (β) -non pathogène sur haricot (var. Roi des Beurres)- reconnaissent également les Ag exocellulaires de *C. lindemuthianum* (*bwambara*, -pathogène sur haricot (var. Roi des Beurres)-.

V.2. Matériel et méthodes

Deux lapins ont été immunisés, l'un contre l'endoPG purifiée, l'autre contre l'ensemble des protéines d'un surnageant de culture -ou les protéines exocellulaires- de *C. lindemuthianum* (β).

V.2.1. Préparation des antigènes

Avant d'être injectés aux lapins, l'endoPG et les protéines exocellulaires ont du être concentrées.

L'endoPG a été concentrée par précipitation à l'acétone à 4°C. Six volumes d'acétone ont été ajoutés à 1 volume d'endoPG purifiée. Cette solution a été maintenue une nuit à 4°C avant centrifugation à 4000 g pendant 30 min. Le culot a été séché à l'air libre et resuspendu dans du PBS-pH 7,4. La suspension a finalement été filtrée stérilement sur une membrane Millipore 0,22 μ m. 300 μ g d'endoPG dans 1,5 ml de PBS-pH 7,4 ont ainsi été obtenus. (Les protéines ont été dosées comme décrit dans les matériel et méthodes en p.20 et l'étalonnage a été réalisé avec différentes concentrations de SAB/PBS.)

Annexe V.1. : composition du tampon PBS

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1,44g/l
KH_2PO_4	0,2g/l
KCl	0,2g/l
NaCl	8,0g/l

pH 7,4

Les protéines d'un surnageant de culture de 6 jours filtré stérilement sur une membrane Sartorius 0,22 μm , ont été concentrées par précipitation au sulfate d'ammonium. Des cristaux de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ont été ajoutés au surnageant, sous agitation constante, jusqu'à atteindre 80% de saturation. Les protéines ont ensuite été sédimentées par centrifugation à 10.000 g pendant 15 min. Le culot a été resuspendu dans du PBS-pH 7,4. Cette solution a été dialysée contre le même tampon afin d'éliminer les résidus éventuels de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ et puis filtrée stérilement sur une membrane Millipore 0,22 μm . Un demi-gramme de protéines exocellulaires dans 1,5 ml de PBS ont ainsi été obtenus.

V.2.2. Immunisation des lapins

Une première injection intradermique a été réalisée avec une émulsion de 0,5 ml d'Ag (100 μg d'endoPG, 165 μg de protéines exocellulaires) et 0,5 ml d'adjuvant complet de Freund (Gibco). 15 jours après, 2 rappels, à 10 jours d'intervalle, ont été effectués. Une émulsion de 0,5 ml d'Ag (100 μg d'endoPG, 165 μg de protéines exocellulaires) et 0,5 ml d'adjuvant incomplet de Freund (Gibco) a été injectée à chaque fois par voie intramusculaire. Huit jours après la dernière injection, du sang a été prélevé. Les sérums en ont été extraits après rétraction du caillot sanguin à l'air libre et élimination des globules rouges résiduels par centrifugation (5 min à 700 g).

V.2.3 Dot-blot sur nitrocellulose

Principe :

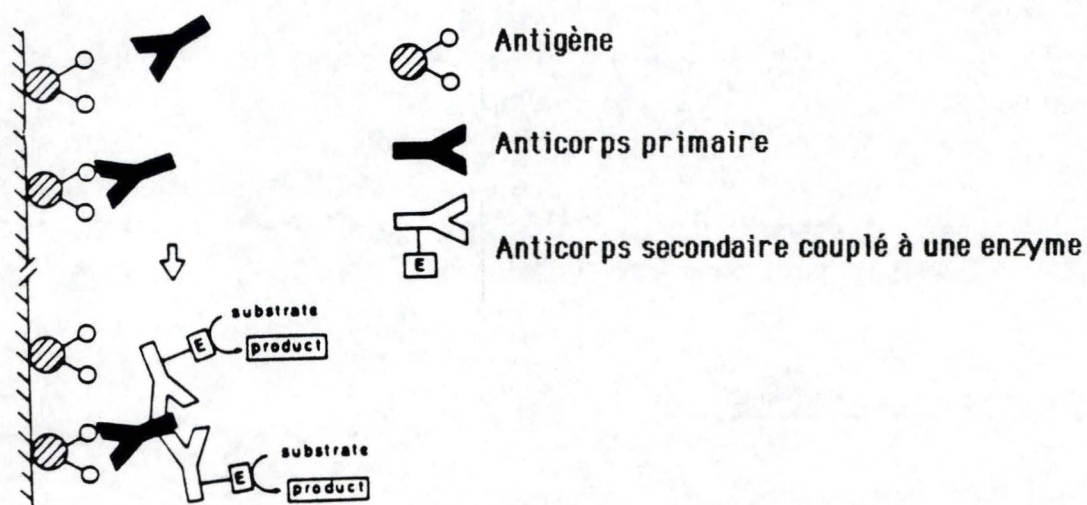
On adsorbe l'antigène sur la feuille de nitrocellulose. Après blocage des sites non spécifiques, la feuille est incubée en présence du polyserum à tester. Une incubation ultérieure avec un Ac couplé à la peroxydase permet, par l'oxydation d'un substrat non coloré en un complexe coloré, de mettre en évidence la présence d'anticorps, et donc de l'antigène, sur le support.

Protocole :

1. Dépôt de l'Ag.

5 μl d'Ag sont déposés sur les languettes de nitrocellulose (Bio-Rad). On dépose 1 μl à la fois en attendant que le dépôt précédent soit bien sec.

fig. V.1. : Elisa indirect : L'antigène est fixé sur le support solide et est reconnu par un anticorps primaire spécifique de cet antigène. Ce dernier sera, à son tour, reconnu par un anticorps secondaire anti-immunoglobuline couplé à une enzyme.



2. Saturation.

Les feuilles de nitrocellulose sont saturées dans une solution de sérum de cheval (Gibco) 10%/PBS-pH 7,4. On incube pendant une nuit à 4°C.

3. Dépôt du premier Ac.

On incube les membranes de nitrocellulose 1h à température ambiante avec le polysérum dilué 20 fois dans du PBS-pH 7,4 contenant 1% de sérum de cheval.

4. Lavage.

On lave 3 fois les membranes pendant 10 min avec du PBS + Tween20 (Merck) 0,1%.

5. Dépôt du deuxième Ac.

On incube la membrane en présence de DAR-Peroxydase (Donkey Anti-Rabbit Peroxydase, Amersham) dilué 500 fois dans du PBS + sérum de cheval 1%, 1 h à 37°C.

6. Lavage.

On lave 3 fois les membranes pendant 10min avec du PBS + 0,1% de Tween20.

7. Révélation.

On révèle avec un mélange de diaminobenzidine (DAB, Sigma) 0,05% et de H₂O₂ (UCB) 0,03%/Tris 50 mM - pH 7,5. On arrête la réaction en plongeant les membranes dans HCl 0,1 N.

V.2.4 Test ELISA (méthode indirecte) [41]

Principe : (fig V.1.)

On fixe l'Ag sur un support et celui-ci est reconnu par des Ac spécifiques qui eux-mêmes seront reconnus par des Ac dits secondaires anti-immunoglobulines, couplés à une enzyme. L'Ac secondaire doit être produit dans une espèce animale différente de celle produisant l'Ac primaire. La phase solide sur laquelle on adsorbe l'Ag peut être du polystyrène, de la nitrocellulose, du papier, du verre, de l'agarose, de la cellulose ou du Sephacryl. Dans la pratique, on utilise le plus souvent les matières plastiques (type polystyrène ou PVC) et le dot-blot sur nitrocellulose, bien que ce dernier ne donne que des informations qualitatives.

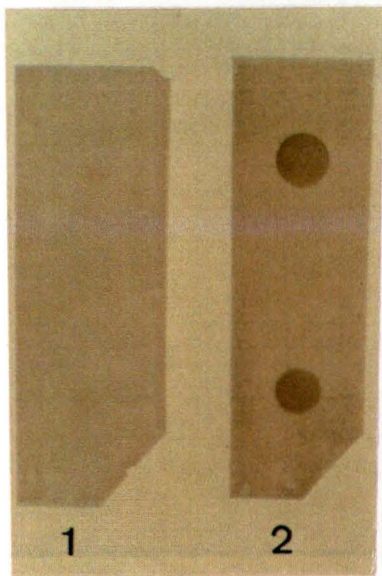
Le dosage de l'Ag est basé sur la transformation d'un substrat peu ou pas coloré en produit très coloré. L'enzyme utilisée ici est la peroxydase.

Protocole :

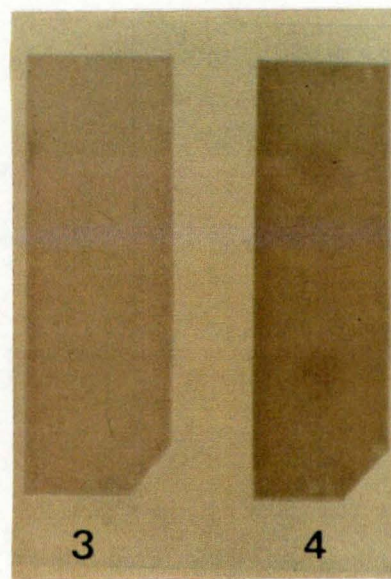
1. Dépôt de l'Ag.

50 µl (environ 10 µg de protéines/ml) sont déposés par puits.

Ag = protéines exocellulaires
(*C. lindemuthianum* (β))



Ag = endoPG
(*C. lindemuthianum* (β))



sérums : 1 et 3 : naïfs (sérums avant immunisation)
2 : anti-protéines exocellulaires (*C. lindemuthianum* (β))
4 : anti-endoPG (*C. lindemuthianum* (β))

fig. V.2. : Dot-blot sur nitrocellulose.

2. Saturation.

Les puits sont vidés de la solution d'Ag et remplis avec une solution de poudre de lait 0,05% /PBS. La plaque est laissée 2 h à 37°C. Cette étape permet de bloquer les sites restants non saturés et d'éviter ainsi l'adsorption non spécifique des Ac primaires et secondaires sur le support solide.

3. Dépôt du premier Ac.

50 μ l du polysérum sont déposés dans chaque puits. La plaque est mise à incuber pendant 1 h à 37°C.

4. Lavage.

Les puits sont lavés 6 fois avec du PBS.

5. Dépôt du deuxième Ac.

50 μ l d'un Ac couplé à une peroxydase, dilué 500 fois dans le tampon PBS, sont déposés dans les puits. On incube 1 h à 37°C.

6. Lavage.

Les puits sont lavés 6 fois avec du PBS.

7. Révélation.

On ajoute 100 μ l d'une solution d'ABTS-H₂O₂ par puits et on laisse incuber 15 min à 37°C.

Solution ABTS-H₂O₂ : -ABTS : Azino-di-[ethyl-benzothiazolin-sulfonate]
(Boehringer)

-H₂O₂ 30% (UCB)

-tampon citrate = Na₂HPO₄.2H₂O (Merck) 20,5 g/l

acide citrique (UCB) 8,9 g/l

pH 5,6

Dissoudre 4,2 mg d'ABTS dans 5,6 ml de tampon citrate. Ajouter 5 μ l d'H₂O₂ dans ce mélange. (la solution est préparée extemporanément)

8. Lecture.

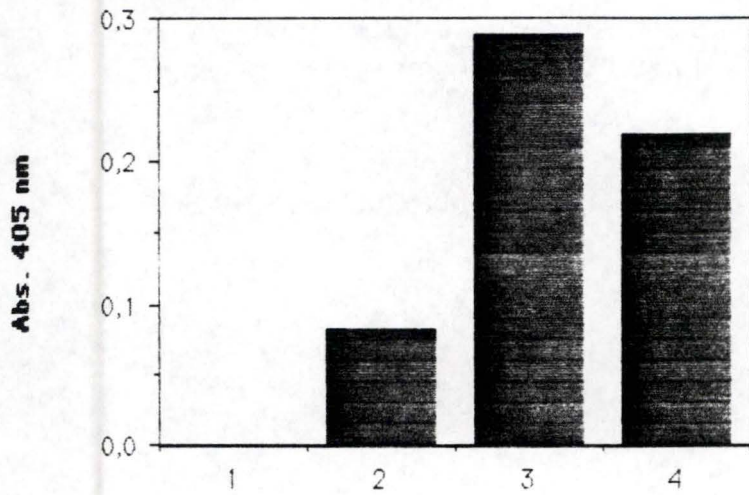
Elle est réalisée par un lecteur ELISA Titertek; l'absorbance est réglée à 405 nm.

V.3. Résultats

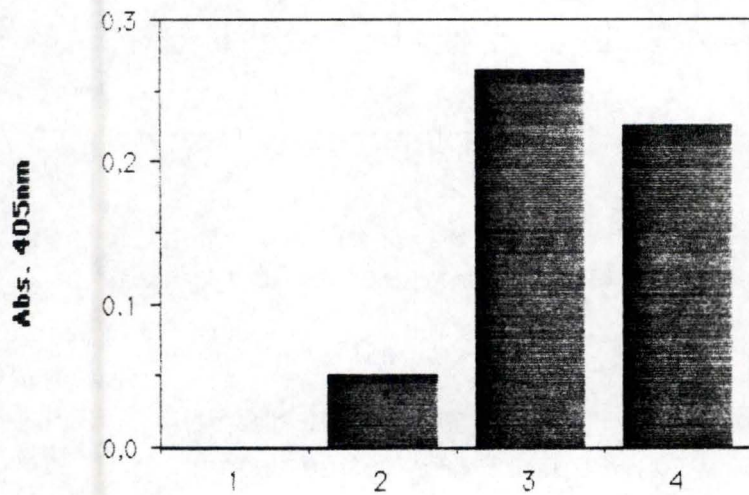
La production d'Ac anti-endoPG et anti-protéines exocellulaires de *C. lindemuthianum* (β) a été vérifiée rapidement par dot-blot sur nitrocellulose. (fig V.2.)

Nous avons ensuite testé les 2 sérums sur les protéines exocellulaires de *C. lindemuthianum* (*bwambara*), une race qui, contrairement à *Colletotrichum*.

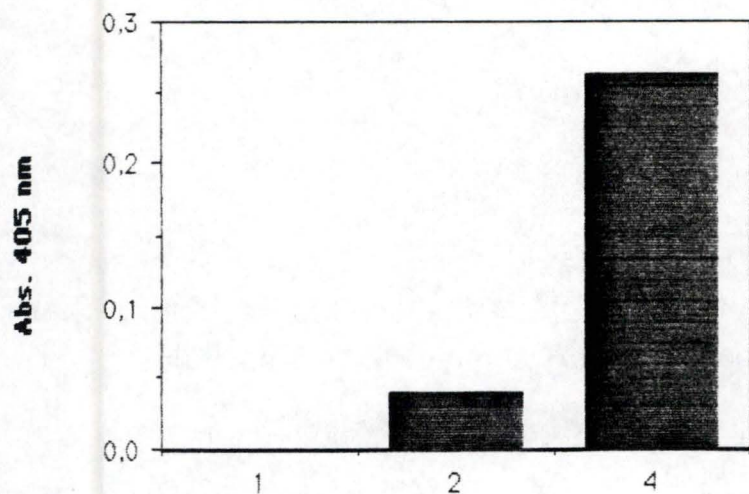
Ag = protéines exocellulaires de *C. lindemuthianum* (bêta)



Ag = protéines exocellulaires de *C. lindemuthianum* (dwambara)



Ag = endoPG de *C. lindemuthianum* (bêta)



Ag = PG d' *Aspergillus niger*

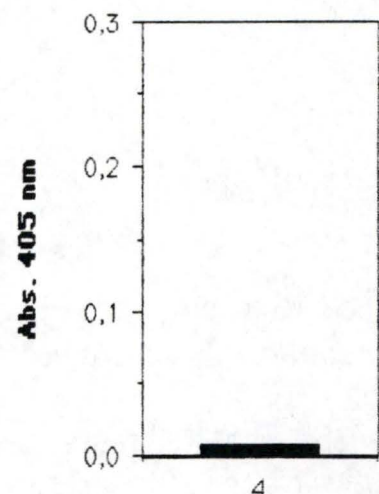


fig. V.2. : Résultats d'un test ELISA.
 1,25 µg d'Ag ont été déposés par puits
 et testés avec différents serums :
 1. blanc
 2. naïf (sérum avant immunisation)
 3. anti-protéines exocellulaires *C.
 lindemuthianum* (β)
 4. anti-endoPG *C. lindemuthianum* (β)

lindemuthianum (β) est pathogène sur le haricot variété Roi des Beurres (Vi. Annexe). Les résultats sont présentés en fig. V.2..

On peut résumer ces chiffres comme suit :

- (1) Les sérums reconnaissent bien leur Ag respectif.
- (2) Le sérum anti-endoPG de *C. lindemuthianum* (β) réagit aussi avec les protéines exocellulaires –l'endoPG en est une, c'est donc normal–.
- (3) Les 2 sérums (anti-endoPG et anti-protéines exocellulaires de *C. lindemuthianum* (β)) reconnaissent les Ag exocellulaires de *C. lindemuthianum* (*bwambara*).
- (4) Le sérum anti-endoPG de *C. lindemuthianum* ne réagit pas avec une préparation de polygalacturonase d'*Aspergillus niger* (Pectinase , Sigma). L'endoPG de *C. lindemuthianum* ne semble donc pas avoir une structure proche de celle d'*A. niger*.

V.4. Discussion

L'endoPG de *C. lindemuthianum* est une molécule clef dans la pathogenèse. C'est la première enzyme dégradant des polysaccharides de paroi végétale à être sécrétée lorsque le champignon pousse dans un milieu à base de parois cellulaires isolées, préparant ainsi le terrain pour d'autres enzymes dégradant des polysaccharides pariétaux. L'endoPG peut en outre, à elle seule, macérer et tuer des tissus végétaux. (cfr. introduction)

Les races β et *bwambara* de *C. lindemuthianum* produisent la même endoPG, comme l'indique le test ELISA ci-dessus. Ces 2 races sont donc susceptibles de causer les mêmes dégâts aux haricots. Or, seule la race *bwambara* est virulente sur le haricot var. Roi des Beurres. Si l'endoPG peut être responsable de graves dégâts cellulaires chez le haricot, elle ne peut à elle seule déterminer la virulence du champignon. Le succès du pathogène dépend donc d'interactions mettant en jeu d'autres molécules. Ici apparaît clairement l'importance des éliciteurs et autres signaux moléculaires propres à chaque race donnée de *C. lindemuthianum* qui déclenchent les systèmes de défense de la plante.

V.5. Perspectives

Le sérum anti-endoPG qui reconnaît l'endoPG peut aussi reconnaître les 2

petites fractions contaminantes de l'endoPG purifiée. Un western-blot est à envisager pour vérifier ceci.

On a déjà démontré l'efficacité de techniques immunocytochimiques pour déterminer la distribution de produits pathogènes (protéines exocellulaires de surnageant de culture) de *C. lindemuthianum* dans des tissus de haricot infectés. [42] Mais en ce qui concerne la localisation précise, par marquage immunologique, de molécules supposées être impliquées dans la régulation des interactions hôte-pathogène, rien n'a encore été fait. L'endoPG joue un rôle déterminant dans l'interaction haricot-*C. lindemuthianum*. Comme on dispose d'anticorps anti-endoPG, on peut entamer une telle étude.

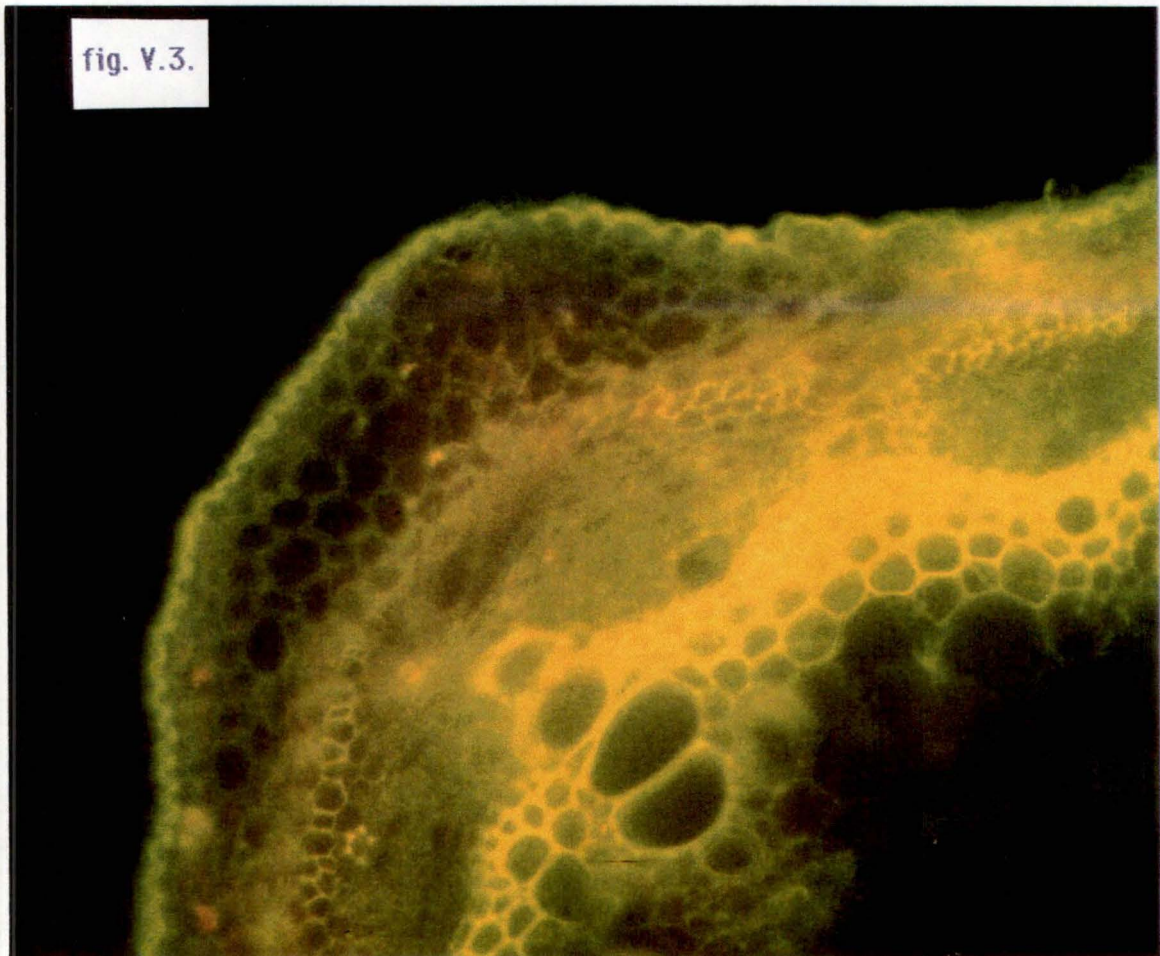
La mise au point d'un protocole de marquage immunocytochimique est souvent longue. Les modalités pratiques du marquage sont propres à chaque cas et doivent être définies en fonction de toute une série d'expériences préliminaires. Il faut ainsi trouver un mode de fixation qui préserve bien l'antigénicité, déterminer les dilutions optimales des Ac primaires et secondaires, définir les temps idéaux d'incubation et surtout, il faut résoudre les problèmes de marquage non spécifique. Nous ne disposons plus suffisamment de temps pour commencer une étude immunocytochimique. Nous avons néanmoins fait un essai de marquage en microscopie à fluorescence. (fig. V.3.).

Le protocole suivant a été utilisé : [41]

1. Coupe : des coupes transversales d'environ 100 μm ont été effectuées sur des tiges de haricots infectés et non infectés.
2. Fixation : les coupes ont été fixées, sur lamelle porte objet pour microscope optique, par une solution de paraformaldéhyde 2% - tp. PO_4^{3-} 100 mM - pH 7,4, pendant 2 h à température ambiante. Une goutte a été déposée par coupe.
3. Marquage :
Les coupes ont été rincées (1 goutte est déposée puis réabsorbée par buvardage) 3 fois 10 min avec de PBS, puis elles ont été incubées 1 h à température ambiante dans une solution de NGS (Normal Goat Serum, Sigma) 10% + BSA (Sigma) 1% /PBS. Après cette étape de saturation, les coupes ont été incubées 2 h à température ambiante avec l'Ac primaire (anti endoPG) dilué 100 fois dans du PBS + BSA 1%. Elles ont ensuite été lavées 3 fois 10 min avant d'être mises à incuber 90 min à température ambiante avec un Ac secondaire anti Ig lapin fluorescent (anti-rabbit Ig fluorescein linked whole antibody, Amersham) dilué 20 fois dans du PBS. Pour finir les coupes ont été lavées 3 fois 10 min.
4. Observation :
Avant de déposer le couvre objet, une goutte de Citifluor (PVBA Laborimpex SP) a été déposée sur chaque coupe; ce produit évite une

disparition trop rapide de la fluorescence.

L'observation a été faite au microscope optique à fluorescence. (fig. V.3.)
Malheureusement, la fluorescence non spécifique, importante, empêche la localisation de l'endoPG dans les cellules infectées.



VI. Conclusions

Une endoPG a pu être obtenue par fermentation d'un milieu liquide à base d'acide polygalacturonique par *Colletotrichum lindemuthianum*. Nous avons mis au point un protocole simple de purification de l'endoPG. La fraction endoPG purifiée n'est pas de pureté totale mais elle est toutefois beaucoup plus propre qu'une préparation commerciale d'endoPG (Pectinase, Sigma). Comme l'activité exoPG qui interfère avec l'activité endoPG a été éliminée, on a pu caractériser l'endoPG. L'enzyme est une protéine faiblement glycosylée de 37.000 daltons ayant un P_{H_i} de 6,5 et qui présente un optimum thermique à 50°C et un pH optimum compris entre 5 et 5,5. L'enzyme est incapable d'hydrolyser un gel pectate-calcium.

Nous avons en outre démontré que, si l'endoPG de *C. lindemuthianum* peut être responsable de graves dégâts cellulaires chez le haricot (cfr. introduction), elle ne peut à elle seule expliquer la virulence du pathogène puisque la race β , non virulente, et la race bwambara, virulente sur le haricot var. Roi des Beurres, produisent la même endoPG.

Annexe : quelques photos de l'infection du haricot par *Colletotrichum lindemuthianum*

Les races β et bwambara de *C. lindemuthianum* ont été inoculées à des plants de haricot (*Phaseolus vulgaris*) var. Roi des Beurres et 4 jours après, des photos ont été prises.

Des graines de haricot var. Roi des Beurres ont été plantés dans des pots de terreau dans une enceinte à 25°C avec une humidité relative de 85% et une photopériode jour/nuit de 14h/10h. On a repiqué en même temps *C. lindemuthianum* sur un nouveau milieu de sporulation. Après 10 jours, quand les haricots étaient au stade 2 feuilles, ceux-ci ont été pulvérisés uniformément avec une suspension de spores jusqu'à saturation (c-à-d. jusqu'à ce que des gouttes se forment et coulent sur la plante). La suspension de spores a été diluée avec de l'eau à une concentration d'environ 10^6 /ml. Du tween20 0,01% a été ajouté comme agent mouillant.

La race β de *C. lindemuthianum* n'est pas virulente et la race bwambara est virulente.



plante non inoculée

plante inoculée avec
C. lindemuthianum (β)

plante inoculée avec
C. lindemuthianum
(bwambara)

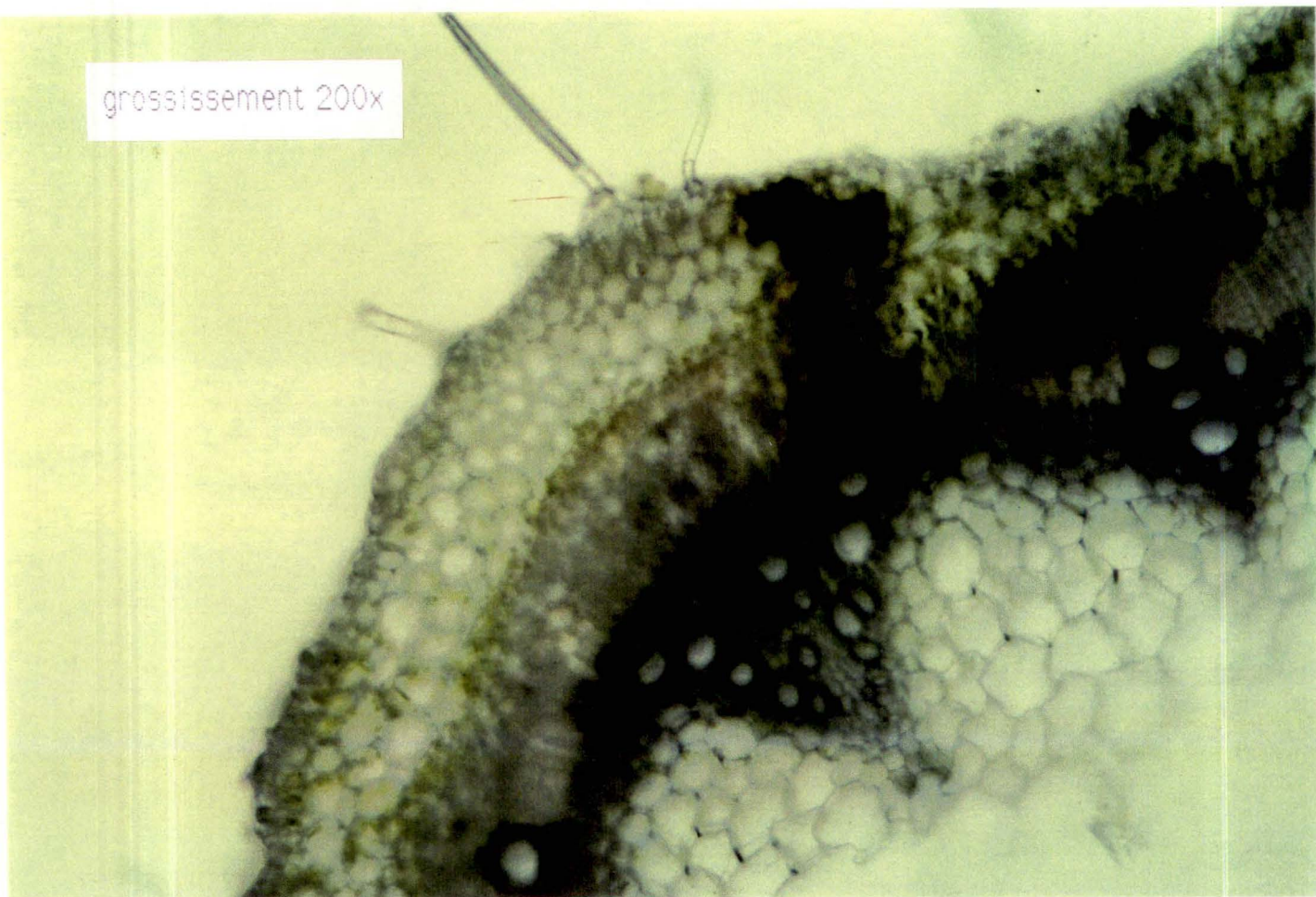
(photo prise 4 jours après inoculation)



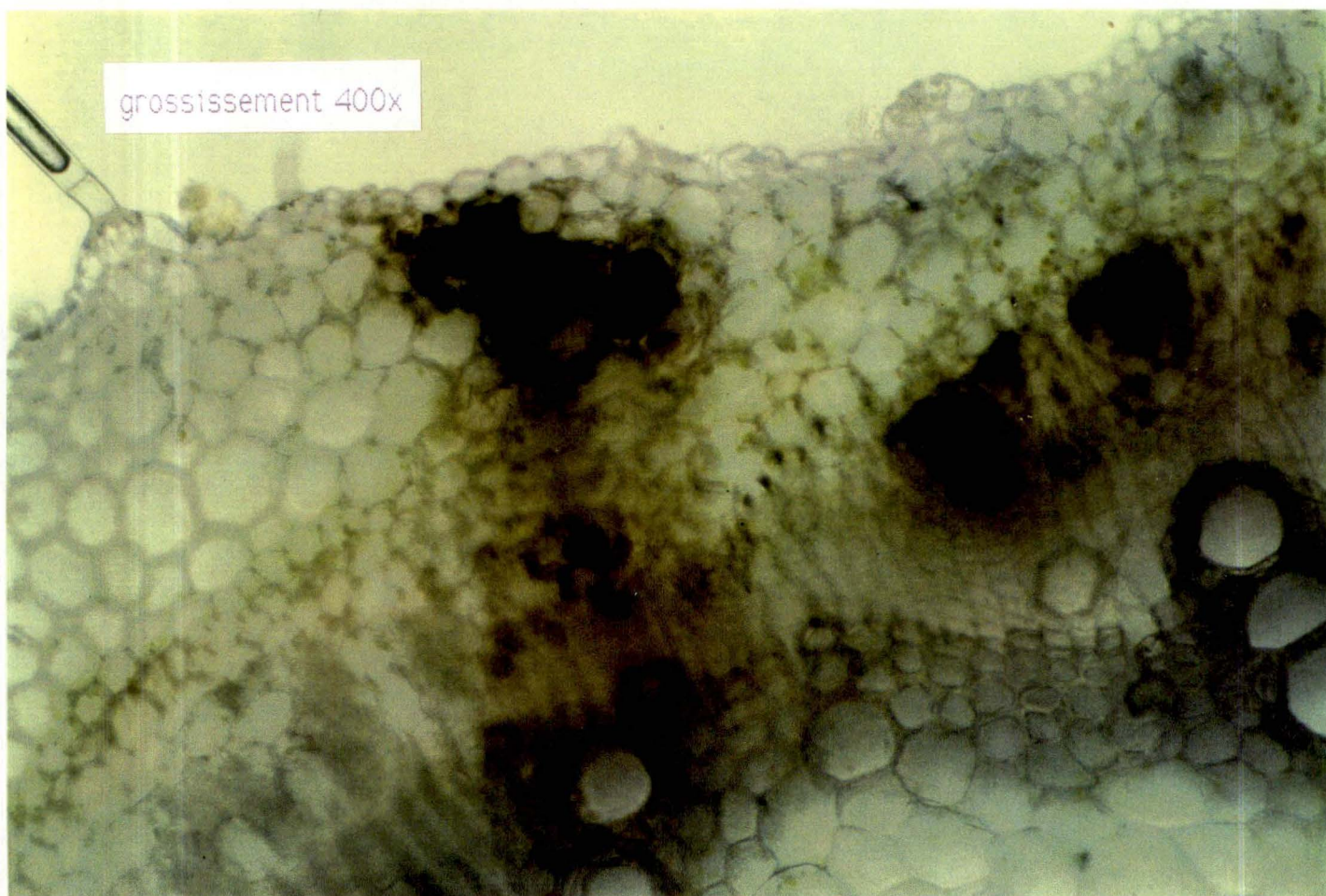
L'anthracnose du haricot est
caractérisée par des
lésions brunâtres, surtout
sur les nervures des
feuilles.

Coupe transversale de tige de haricot infecté, 4 jours après inoculation avec *C. lindemuthianum* (bwambara).

grossissement 200x



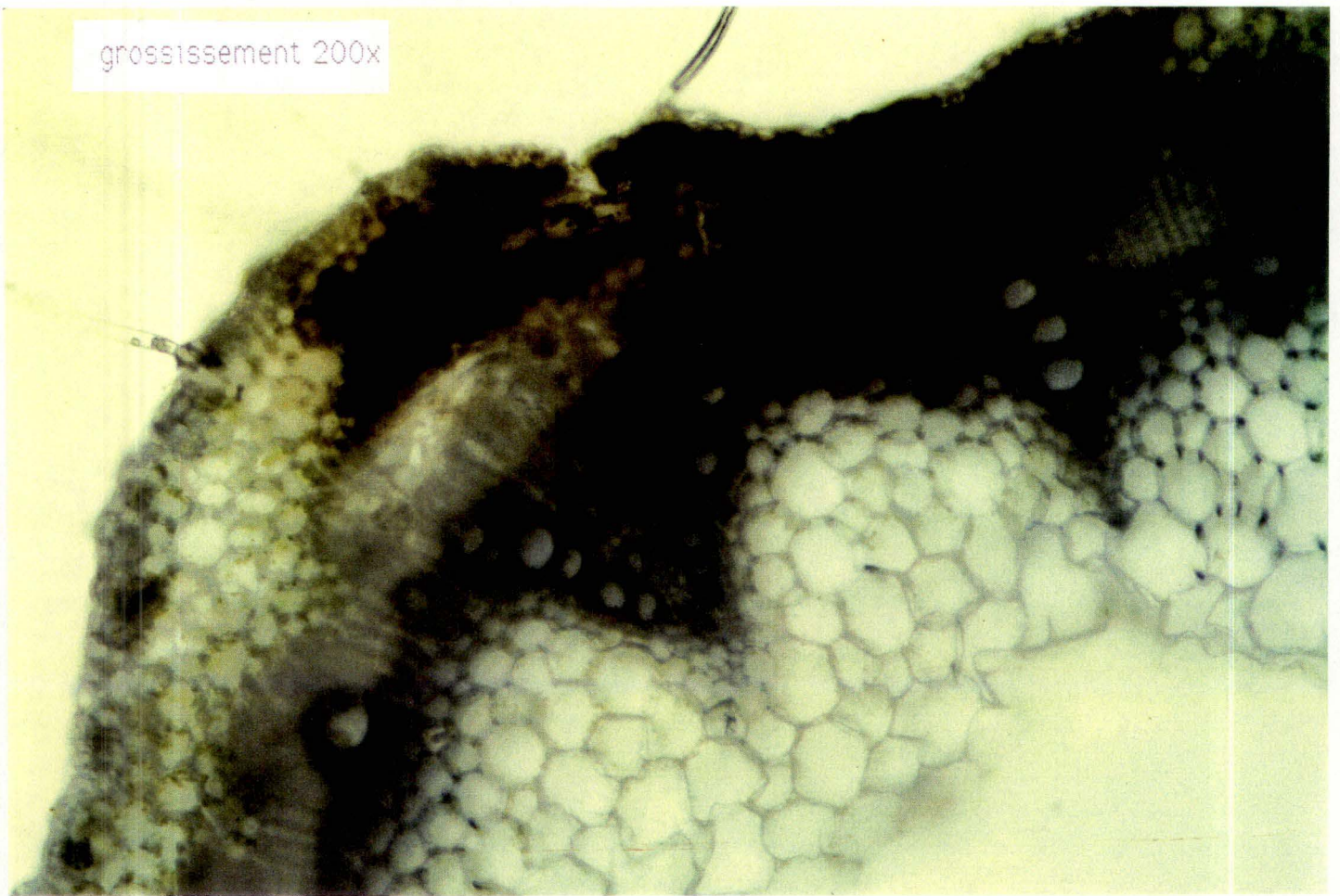
grossissement 400x



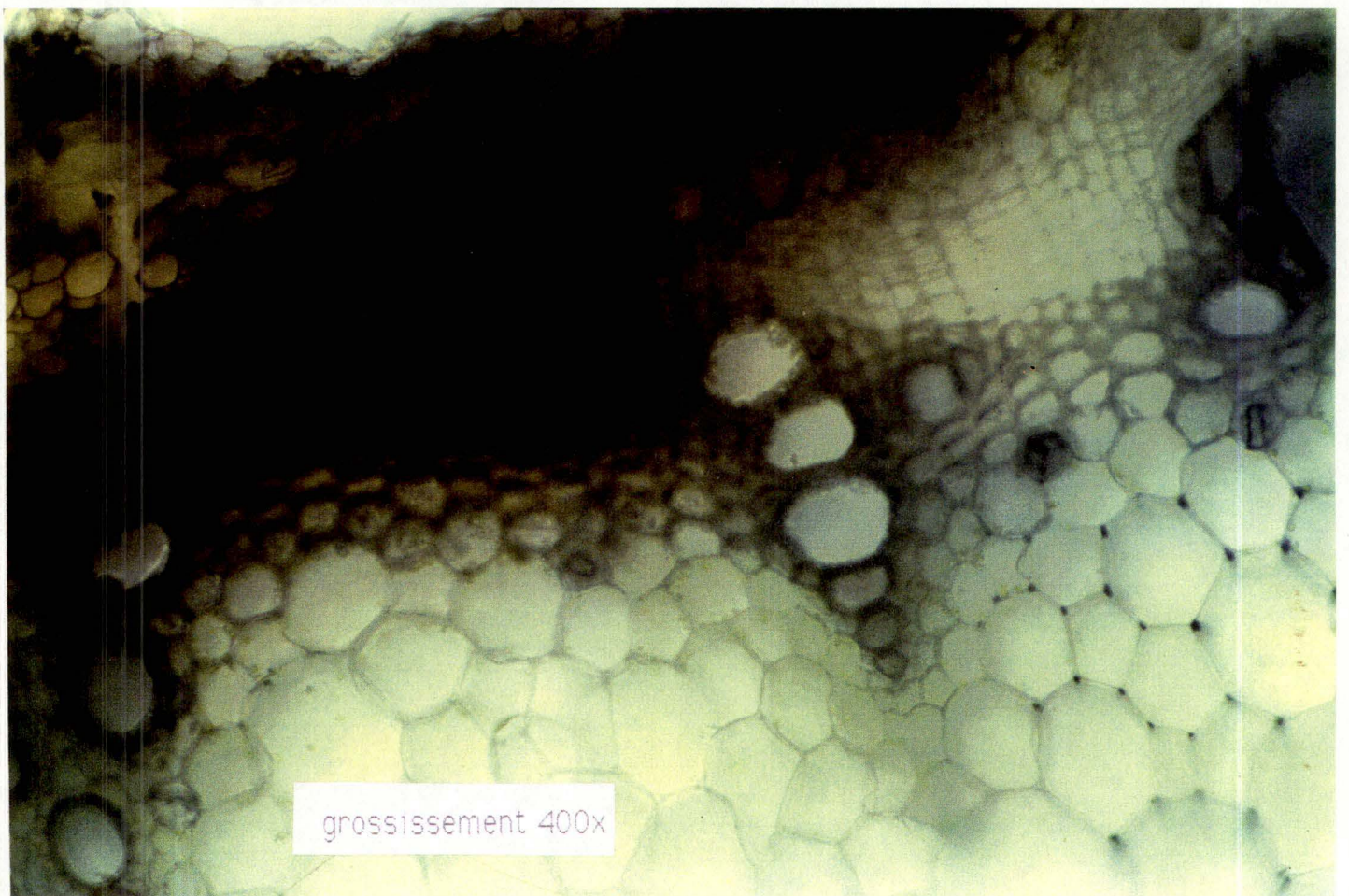
Coupes transversales de tige de haricot infectés par *C. lindemuthianum* (*l.wambara*).

Les cellules infectées finissent par se nécroser.

grossissement 200x



grossissement 400x



Références bibliographiques

1. J.-M. Thibault (1983).
Etude structurale des substances pectiques à l'aide d'une endopolygalacturonase d' *aspergillus niger* : purification, propriétés et possibilités d'utilisation de cette enzyme,
Thèse : Université de Nantes.
2. L. Saulnier (1987).
Etude structurale des substances pectiques de la pulpe de raisin (Carignan rouge),
Thèse : Université Paul Sabatier Toulouse n° 193.
3. M. Mc Neil, A. G. Darvill, S. C. Fry, P. Albersheim (1984).
Structure and function of the primary cell walls of plants,
Ann. Rev. Biochem., 53 : 625-633.
4. M. C. Jarvis (1984).
Structure and properties of pectin gels in plant cell walls,
Plant, Cell and Environment 7 : 153-164.
5. E. R. Morris, D. A. Powell, H. J. Gidley, D. A. Rees (1982).
Conformations and interactions of pectins. 1. Polymorphism between gel and solid states of calcium polygalacturonate,
J. Mol. Biol., 155 : 507-516.
6. F. M. Rombouts, A. G.-J. Voragen, M. F. Van Leuwen, C. Geraeds, H. A. Schols, W. Pilnik (1987).
The arabinanases of *Aspergillus niger*,
in Etude structurale des substances pectiques de la pulpe de raisin,
p. 19 [2].
7. S. Emi, T. Yamamoto (1972).
in Etude structurale des substances pectiques de la pulpe de raisin,
p. 19 [2].
8. H. Nakano, S. Takeniski, Y. Watanabe (1985).
Purification and properties of two galactanases from *Penicillium citrinum*,
Agric. Biol. Chem., 49 : 3445-3454.

9. Y. Hashimoto (1971).
in Etude structurale des substances pectiques de la pulpe de raisin,
p. 19 [2].
10. L. Rexova-Benkova, O. Markovic (1976).
Pectic enzymes,
Adv. Carbohydr. Chem. Biochem., 33 : 323-385.
11. W. Pilnik, F.M. Rombouts (1981).
Pectic enzymes, in Enzymes in food processing (G. G. Birch,
N. Blakebrough, K. J. Parker Eds.),
Applied Science Publishers LTD London, 105-128.
12. P. D. English, A. Maglothin, K. Keegstra, P. Albersheim (1972).
A cell wall degrading endopolygalacturonase secreted by *Colletotrichum
lindemuthianum*,
Plant Physiol., 49 : 293-297.
13. J. P. Barthe, D. Cantenys, A. Touzé (1981).
Purification and characterization of two polygalacturonases secreted by
Colletotrichum lindemuthianum,
Phytopath. Z., 100 : 162-171.
14. A. Collmer (1986).
The role of pectic enzymes in plant pathogenesis,
Ann. Rev. Phytopathol., 24 : 383-409.
15. M. S. Mount, D. F. Bateman, H. G. Basham (1970).
Induction of electrolyte loss, tissue maceration and cellular death of
potato tissue by an endopolygalacturonase transeliminase,
Phytopathology, 60 : 924-931.
16. A. R. Weinhold, J. Motta (1973).
Initial host responses in cotton to infection by *Rhizoctonia solani*,
Phytopathology, 63 : 157-162.
17. R. J. O'Connell, J. A. Bailey, D. V. Richmond (1985).
Cytology and physiology of infection of *Phaseolus vulgaris* by
Colletotrichum lindemuthianum,
Physiol. Plant Pathol., 27 : 75-98.

18. M. L. Fisher, A. J. Anderson, P. Albersheim (1973).
Host-pathogen interactions - VI. A single plant protein efficiently inhibits endopolygalacturonases secreted by *Colletotrichum lindemuthianum* and *Aspergillus niger*,
Plant Physiol., 51 : 489-491.
19. C. Lafitte, J. P. Barthe, J. L. Montillet, A. Touzé (1984).
Glycoprotein inhibitors of *Colletotrichum lindemuthianum* endopolygalacturonases in near isogenic lines of *Phaseolus vulgaris* resistant and susceptible to anthracnose,
Physiol. Plant Pathol., 25 : 39-53.
20. N. Blumenkrantz, G. Asboe-Hansen (1973).
New Method for quantitative détermination of uronic acids,
Anal. Biochem., 54 : 484-489.
21. J. B. Sumner (1921).
Dinitrosalicylic acid : a reagent for the estimation of sugar in normal and diabetic urine,
J. Biol. Chem., 47 : 5-9.
22. J. B. Sumner (1925).
The estimation of sugar in diabetic urine, using dinitrosalicylic acid,
J. Biol. Chem., 62 : 287-290.
23. J. Remacle (1984).
Techniques biochimiques, chap. III : les chromatographies,
FNNDP Namur.
24. B. Alberts, D. Bray, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, J. D. Watson (1983).
Molecular biology of the cell, p.1102,
Garland Publishing Inc., New-York & London.
25. D. A. Rees (1977).
Polysaccharides shapes, p.49,
Outline studies in biology, Chapman and Hall.
26. P. Albersheim, A. D. Darvill (1985).
Les oligosaccharines,
Pour la Science, 97 : 18-26.
27. C. J. Lamb, M. A. Lamton, R. A. Dixon (1989).
Signals and transduction mechanisms for activation of plant defenses against microbial attack,
Cell, 56 : 215-224.

28. O. H. Lowry, N. J. Rosebrough, A. Lewis Farr, R. J. Rendall (1951).
Protein measurement with the Folin phenol reagent,
J. Biol. Chem., 193 : 265-275.

29. U. K. Laemmli (1970).
Cleavage of structural proteins during the assembly of the bacteriophage
T4,
Nature, 227 : 680-685.

30. I. J. Goldstein, C. E. Hollerman, E. E. Smith (1965).
Protein-carbohydrate interaction. II. Inhibition studies on the
interaction of concanavalin A with polysaccharides,
Biochemistry, 4 : 876-883.

31. J. Lim, Y. Yamasaki, Y. Susuki, J. Ozawa (1980).
in Etude structurale de substances pectiques à l'aide d'une
endopolygalacturonase d' *Aspergillus niger* : purification, propriétés et
possibilités d'utilisation de cette enzyme [1].

32. K. Heinrichova, M. Dzurova (1979).
Purification, characterization and mode effect of another
endo-D-galacturonase from *Aspergillus niger*,
Coll. Czech. Chem. Comm., 46 : 3145-3156.

33. M. Yamasaki, T. Yasui, K. Arima (1966).
in Etude structurale des substances pectiques à l'aide d'une
endopolygalacturonase d' *Aspergillus niger* : purification, propriétés et
possibilités d'utilisation de cette enzyme [1].

34. A. Endo (1964).
in Etude structurales des substances pectiques à l'aide d'une
endopolygalacturonase d' *Aspergillus niger* : purification; propriétés et
possibilités d'utilisation de cette enzyme [1].

35. O. Markovic, K. Heinrichova, B. Jenkey (1975).
Pectolytic enzymes from banana,
Coll. Czech. Chem. Comm., 40 : 769-774.

36. S. Nasuno, M. P. Starr (1966).
Polygalacturonase of *Erwinia carotovora*,
J. Biol. Chem., 241 : 5298-5306.

37. L. L. Strand, M. E. Corden, D. L. Mac Donald (1976).
Characterization of two endopolygalacturonase isozymes produced by
Fusarium oxysporum f. sp. *lycopersici*,
Biochim. Biophys. Acta, 429 : 870-883.

38. S. G. Lee, C. A. West (1981).
Properties of *Rhizopus stolonifer* polygalacturonase, an elicitor of
caspene synthetase activity in Castor Bean (*Ricinus communis* L.)
seedlings,
Plant Physiol., 67 : 640-645.

39. Pharmacia Fine Chemicals (1983).
Affinity chromatography : principles & methods.

40. Pharmacia Fine Chemicals (1982).
Electrofocusing : principles & methods.

41. P. Tijssen (1985).
Practice and theory of enzyme immunoassays. Vol. 15 : Laboratory
techniques in biochemistry and molecular biology,
Ed. by R. H. Burdon and P. H. Van Knippenberg, Elsevier.

42. R. J. O'Connell, J. A. Bailey (1986).
Immunogold labeling of fungal antigens in cells of *Phaseolus vulgaris*
infected by *Colletotrichum lindemuthianum*,
Physiol. Mol. Plant Pathol., 28 : 99-105.

43. A. Koller, H. Neukom (1969).
Untersuchungen über den abbaumechanismus einer gereinigten
polygalakturonase aus *Aspergillus niger*,
Eur. J. Biochem., 17 : 485-489.

44. R. Pressey, J. K. Avants (1973).
Two forms of polygalacturonase in tomatoes,
Biochim. Biophys. Acta, 309 : 363-369.

45. R. D. Cooke, C. E. M. Ferber, L. Kanagasabapathy (1976).
Purification and characterisation of polygalacturonases from a
commercial *Aspergillus niger* preparation,
Biochim. Biophys. Acta, 452 : 440-451.

46. M. L. Fisher, A. J. Anderson, P. Albersheim (1973).
Host-pathogen interactions - VI. A single plant protein efficiently inhibits endopolygalacturonases secreted by *Colletotrichum lindemuthianum* and *Aspergillus niger*,
Plant physiol., 51 : 489-491.
47. O. Markovic, A. Slezarik (1977).
Isolation and characterization of one form of tomato endo-D-galacturonanase,
Coll. Czech. Chem. Comm., 42 : 173-179.
48. J. F. Thibault, C. Mercier (1979).
Aspergillus niger endopolygalacturonases : characterization and some properties,
J. of Food Biochem., 2 : 379-393.
49. M. T. Templeton, C. J. Lamb (1988).
Elicitors and defense gene activation,
Plant, Cell and Environment, 11 : 395-401.
50. S. A. Hedrick, J. H. Bell, T. Boller, C. J. Lamb (1988).
Chitinase cDNA cloning and mRNA induction by fungal elicitor, wounding, and infection,
Plant Physiol., 86 : 182-186.
51. S. Kauffmann, M. Legrand, M. Geoffroy, B. Fritig (1987).
Biological function of 'pathogenesis-related' proteins : four PR proteins of tobacco have β -1,3-glucanase activity,
EMBO Journal, 6 : 3209-3212.
52. A. M. Showalter, J. N. Bell, C. L. Cramer, J. A. Bailey, J. E. Varner, C. J. Lamb (1985).
Accumulation of hydroxyproline-rich glycoprotein mRNAs in response to fungal elicitor and infection,
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82 : 6551-6555.
53. G. P. Bolwell, M. P. Robbins, R. A. Dixon (1985).
Metabolic changes in elicitor-treated bean cells - Enzymic responses associated with rapid changes in cell wall components,
Eur. J. Biochem., 148 : 571-578.

54. J. K. Sharp, M. McNeil; P Albersheim (1984).
The primary structures of one elicitor-active and seven elicitor-inactive hexa(β -D-glucopyranosyl)-D-glucitols isolated from the mycelial walls of *Phytophthora megasperma* f. sp. *glycinea*,
J. of Biol. Chem., 259 : 11321-11336.
55. A. G. Darvill, P. Albersheim (1984).
Phytoalexins and their elicitors : a defence against microbial infection in plants,
Ann. Rev. of Plant Physiol., 35 : 243-275.
56. R. M. Bostock, R. A. Laine, J. A. Kuc (1982).
Factors affecting the elicitation of sesquiterpenoid phytoalexin accumulation by eicosapentaenoic and arachidonic acids in potato,
Plant Physiol., 70 : 1417-1424.
57. W. E. Schmidt, J. Ebel (1987).
Specific binding of a fungal glucan phytoalexin elicitor to membrane fractions from soybean *Glycine max*,
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84 : 4117-4121.
58. J. N. Bell, R.A. Dixon, J. A. Bailey, P. M. Rowell, C. J. Lamb (1984).
Differential induction of chalcone synthase mRNA activity at the onset of phytoalexin accumulation in compatible and incompatible plant-pathogen interactions,
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81 : 3384-3388.
59. J. N. Bell, T.B. Ryder, V. P. M. Wingate, J. A. Bailey, C. J. Lamb (1986).
Differential accumulation of plant defense gene transcripts in a compatible and incompatible plant-pathogen interaction,
Mol. and Cell. Biol., 6 : 1615-1623.