

ETUDE DES ENZYMES PECTINOLYTIQUES
ET CELLULOLYTIQUES D'UNE SOUCHE
MONOSPORE DE *FUSARIUM f. s. ALBEDINIS*
(Kill et Maire) MALENÇON

D. DUBOST, Leïla KECHACHA et B. RETHER

L'observation histologique des plantes infectées montre que les parasites vasculaires sont capables de rompre la barrière de la protection constituée par les tissus superficiels et corticaux des racines et des tiges.

Le cheminement inter et intracellulaire des hyphes prouve que ces champignons possèdent un arsenal enzymatique capable d'attaquer les membranes squelettiques et en particulier la cellulose et la pectine qui sont les deux constituants essentiels.

On sait que de nombreux champignons sont capables de produire de telles enzymes *in vitro*. Les parasites vasculaires semblent à peu près tous, sinon tous, capables de se développer avec de la cellulose ou de la pectine comme unique source de carbone. Les

travaux concernant la production *in vitro* de ces enzymes sont nombreux. Ils ont fait l'objet de synthèses détaillées (WOOD, 1960 ; HUSAIN et KELMAN, 1959 ; WOOD, 1967).

Dans ces conditions, il était tentant de relier la virulence et le pouvoir pathogène de ces microorganismes à leur possibilité de synthétiser des pectinases et des cellulases. Plusieurs arguments allaient à l'encontre de cette hypothèse :

— Beaucoup de microorganismes saprophytes possèdent un pouvoir cellulolytique et pectinolytique élevé.

— Les solutions purifiées d'enzymes sont impuissantes à reproduire les symptômes pathologiques sur une plante saine (MAC INTYRE, 1965).

— On ne retrouve pas toujours dans les plantes attaquées la totalité des enzymes mises en évidence *in vitro* (WAGGONER et DIMOND, 1955, MATTA et DIMOND, 1963).

— Des mutants de *Fusarium oxysporum* f. s. *lycopersici* qui ont perdu leurs propriétés pectinolytiques *in vitro* demeurent virulents (MANN, 1962).

Cependant, les acquisitions récentes concernant la biochimie des enzymes pectinolytiques ont permis une nouvelle approche du problème :

— Les pectinases d'abord classées en pectine méthyl-estérases et polygalacturonidases se sont révélées être en fait beaucoup plus nombreuses (BATEMAN & MILLAR, 1966).

— Leur synthèse *in vitro* par le parasite et leur action sur le substrat sont largement tributaires du milieu de culture utilisé (BATEMAN, 1966).

— Enfin, et cette constatation est en corrélation avec la précédente, le comportement du parasite *in vitro* ne reflète pas obligatoirement son activité à l'intérieur de la plante (BATEMAN et MILLAR, 1966).

Le problème ainsi posé, nous avons entrepris de préciser le rôle joué par les pectinases et les cellulases dans l'action pathogène du *Fusarium oxysporum* f.s. *albedinis* vis-à-vis du Palmier-dattier.

Dans une première étape, il nous fallait d'abord déterminer le comportement *in vitro* d'une souche monospore considérée comme

virulente. L'action de la température, du pH, des sources de carbone et des sources d'azote sur la croissance a été étudiée (N. BOUNAGA, 1970). Il fallait ensuite caractériser les pectinases et les cellulases que cette souche était susceptible de synthétiser sur des milieux de cultures artificiels. Ce sont les résultats de cette seconde étape que nous exposons dans la présente note.

I. Matériel et méthodes

La souche utilisée est la souche monospore conservée à notre laboratoire sous la dénomination F5 Mol. Cette souche est maintenue en culture sur PDA depuis 1967. Les inoculum employés sont prélevés sur les cultures jeunes (8 - 10 jours) obtenues sur PDA.

Les tests enzymatiques sont opérés à partir de filtrats de culture en milieu liquide stable. La solution de base de ces milieux est constituée par un Kzapeck modifié (nitrate de sodium remplacé par du phosphate d'ammonium).

Les substrats utilisés sont d'une part, la pectine de citron pour les pectinases et d'autre part la carboxy-méthyl-cellulose (C.M.C.) pour les cellulases*.

Les filtrats de culture sont testés après centrifugation (5 000 t/m - 30 minutes).

II. Expériences préliminaires

La souche F5 Mol a été considérée comme virulente après inoculation de plantules, suivant la méthode utilisée par BULIT et al., (1967). Des cultures préliminaires ont été effectuées pour vérifier la croissance de cette souche sur différents substrats. Les résultats sont portés sur le tableau I.

La souche utilisée pousse bien sur pectine et différentes formes de cellulose. Elle ne semble pas susceptible de métaboliser la lignine.

III. Mise en évidence de la poly-méthyl-esterase

Le test est pratiqué sur un filtrat de culture sur pectine. L'action enzymatique est déterminée par la mesure de l'augmentation d'acidité d'une solution de pectine.

* Produits Fluka, Buchs, Suisse.

TABLEAU I

Sources de carbone	Croissance	Observations
Glucose	+++	
Saccharose	+++	
Lignine de palmier *	+	Départ très lent (après 1 mois d'incubation à 28°)
Pectine de citron	+++	Liquéfaction rapide
Cellulose de palmier **	+++	Départ lent
C.M.C.	+++	Liquéfaction rapide
Cellulose Whatman	++	Départ lent
Fibres de coton	++	Départ lent

* La lignine de palmier a été isolée et purifiée dans notre laboratoire. Il est possible qu'elle contienne des traces de celluloses

** La cellulose de palmier a été aussi isolée et purifiée par nous

Le mélange réactionnel renfermant :

20 ml d'une solution de pectine à 1,5 %,

5 ml d'une solution NaCl 2 N,

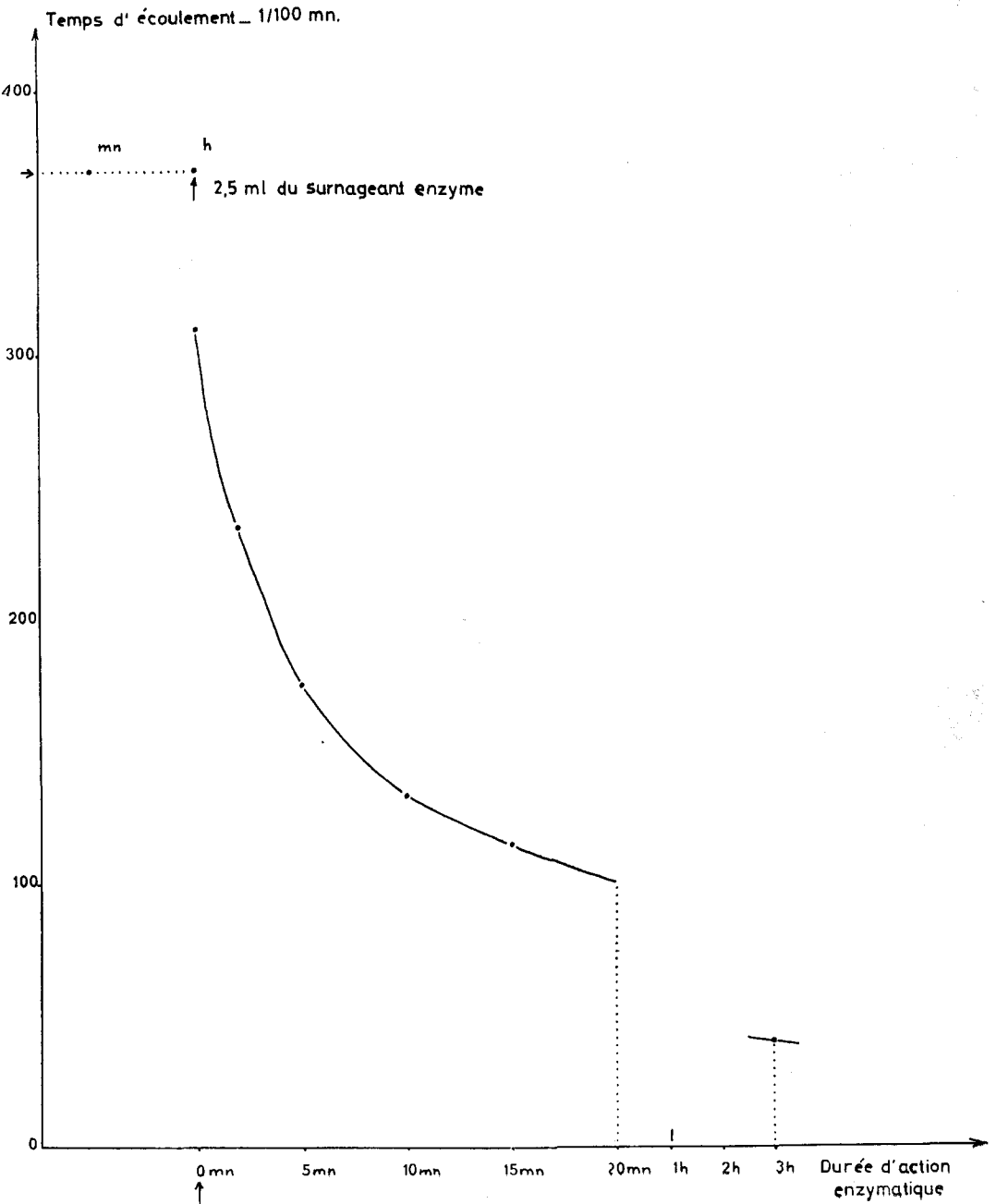
5 ml de filtrat centrifugé

est ajusté à pH 7. L'acidité libérée est dosée par titration continue avec NaOH pendant une heure.

TABLEAU II

Filtrat testé	Volume en ml de NaOH N/100 nécessaire pour ramener le pH à 7	
	Expérience 1	Expérience 2
Filtrat témoin : 5 ml de filtrat d'un milieu non ensemencé	0,2	0,2
Filtrat de culture de 10 jours	7,7	7,9
Filtrat de culture de 10 jours chauffé pendant 10° à 80°	0,2	0,3

FIGURE 1
Activité enzymatique d'un filtrat de culture sur pectine



Il est donc possible de conclure à la présence d'une substance dans le milieu de culture provoquant l'acidification d'une solution de pectine. Cette substance est active à 37° et pH 7, elle est thermo-sensible. Elle correspond aux caractéristiques de la pectine méthyl-estérase. Nous définissons l'unité enzymatique de P.M.E. comme la quantité d'enzyme contenue dans 1 ml de filtrat qui libère une acidité neutralisée par 1 ml de NaOH N/100 en 1 heure à 37° dans les conditions de l'expérience.

IV. Recherche d'une pectine galacturonidase (P.G.)

1. Méthodes

Le test est pratiqué à partir d'un filtrat de culture sur pectine. L'activité enzymatique est mesurée par la diminution de viscosité d'une solution de pectine.

On introduit dans un tube à essai :

- 10 ml d'une solution aqueuse de pectine à 2 %,
- 5 ml de tampon citrate 0,2 M de pH variable,
- 5 ml de filtrat centrifugé.

La diminution de viscosité est mesurée sur une fraction de 15 ml de ce mélange, dans un viscosimètre d'OSWALT placé à une température rigoureusement constante ($28^{\circ} \pm 0,1^{\circ}$).

La diminution de viscosité est exprimée en fonction du temps.

2. Résultats

Ils sont exprimés sur les courbes des figures 1, 2 et 3.

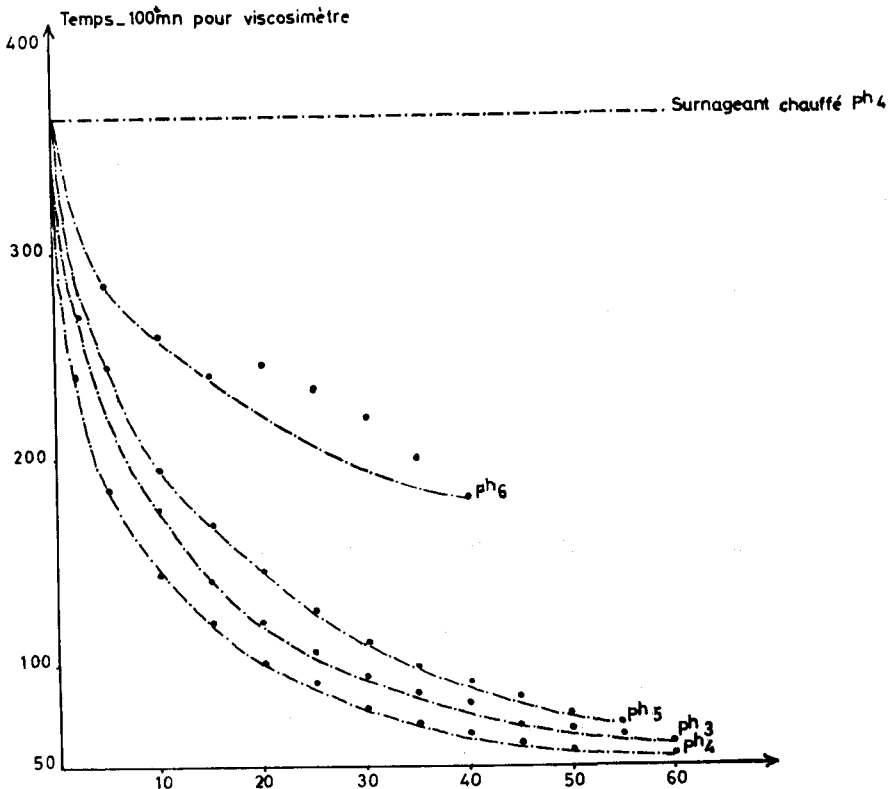
La courbe de la fig. 1 montre que le mélange réactionnel non additionné d'enzyme garde un temps d'écoulement constant. La viscosité diminue rapidement dès l'introduction du filtrat de culture dans le mélange.

La courbe 1 de la figure 2 montre que ce filtrat chauffé 10' à 80° n'a aucune action sur la viscosité. Les courbes 2, 3, 4, 5 de la figure 2 montrent que l'activité enzymatique varie avec le pH du milieu réactionnel. Cette activité est optimum à pH 4 (fig. 3).

Notre souche F5 Mol produit donc une ou des substances capables de dépolymériser la pectine. Cette substance est thermo-sensible et a un pH d'activité maximum voisin de 4.

FIGURE 2

Activité enzymatique de la glycosidase en fonction du pH



V. Essai de caractérisation de la pectine galacturonidase

1. Principe

La classification des enzymes pectinolytiques a été revue par BATEMAN & MILLAR (1966). Il convient de distinguer en fonction :

- du mécanisme des cission de la liaison α -1, 4 glycosidique,
- de la préférence de l'enzyme pour la pectine ou l'acide pectique,
- du lieu de rupture des ponts α -1, 4 dans la chaîne,
- des enzymes du tableau ci-dessous.

A. Scission hydrolytique des liaisons glycosidiques α -1, 4

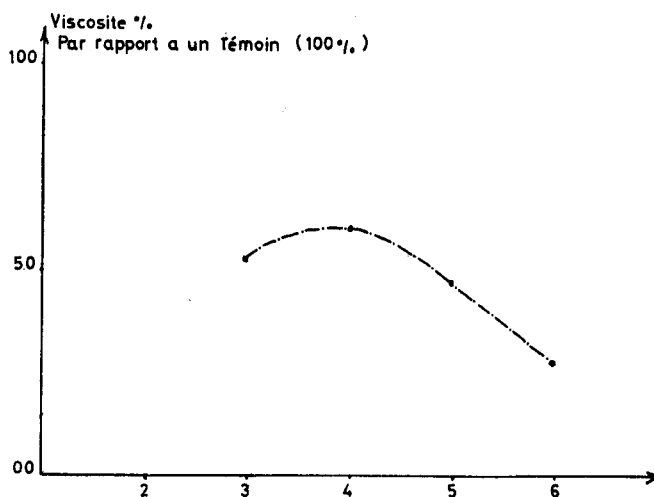
1. Hydrolyse des liaisons au hasard

a. Pectine attaquée de préférence à l'acide pectique

- endo-polyméthyl-galacturonase (endo-PMG)

FIGURE 3

pH optimum d'activité de la glycosidase



- b. Acide pectique attaqué de préférence à la pectine
— endo-polygalacturonase (endo-PG)
2. Hydrolyse des liaisons terminales
 - a. Pectine préférée à l'acide pectique
— exo-polyméthyl-galacturonase (exo-PMG).
 - b. Acide pectique préféré à la pectine
— exo-polygalacturonase (exo-PG).
- B. Scission par trans-élimination des liaisons glycosidiques α -1, 4
1. Scission des liaisons au hasard
 - a. Pectine préférée à l'acide pectique
— endo-pectine-méthyl-trans-éliminase (endo-PMTE).
 - b. Acide pectique préféré à la pectine
— endo-polygalacturonate-trans-éliminase (endo-PGTE)
 2. Scission des liaisons en bout de chaîne
 - a. Pectine préférée à l'acide pectique
— exo-pectine-méthyl-trans-éliminase (exo-PMTE).

b. Acid α pectique préféré à la pectine

— *exo-polygalacturonate-trans-eliminase (exo-PGTE)*.

Dans un premier temps, nous avons recherché si notre souche synthétisait une endo ou une *exo-glycosidase*.

2. *Méthode*

La diminution de viscosité d'une solution de pectine est mesurée en même temps qu'on dose le pouvoir réducteur du milieu réactionnel.

Le dosage du pouvoir réducteur se fait par colorimétrie par la méthode de SOMOGYI-NELSON telle qu'elle est décrite par STAUB (1963).

Dans un ballon placé à 28° on met :

- 30 ml de solution de pectine à 1 %,
- 30 ml de tampon citrate 0,2 M, pH 4,
- 30 ml de surnageant centrifugé.

Une fraction du mélange (3 ml) est prélevée aux temps 0, 1, 2, 3, 5, 10, 15, 20, 30, 40, minutes et 3 heures et l'activité enzymatique est bloquée par refroidissement immédiat à 0°C. Le pouvoir réducteur est ensuite dosé sur chacune des fractions.

3. *Résultats*

Ils sont portés sur la figure 4, courbes 1 et 2.

L'examen de ces courbes montre que la viscosité du substrat diminue rapidement alors que le pouvoir réducteur du mélange réactionnel reste dans un premier temps à peu près stable.

On peut en conclure que les ruptures de liaisons se font au hasard sur la chaîne. Nous sommes donc en présence d'une *endo-glycosidase*.

Nous tentons actuellement de déterminer si cette *endo-glycosidase* est une lyase ou une hydrolase.

VI. Recherche de cellulases

1. *Méthodes*

Le test est pratiqué à partir d'un filtrat de culture sur cellulose. L'activité cellulolytique est mesurée par la diminution de viscosité d'une solution de C.M.C.

On introduit dans un tube à essai :

- 10 ml d'une solution aqueuse de C.M.C. à 1 %,
- 5 ml de tampon phosphate-acide citrique 0,2 M à pH 7,
- 5 ml de filtrat de culture.

La viscosité est mesurée au viscosimètre d'OSWALT comme en IV.

2. Résultats

Ils sont exprimés par les courbes des figures 5, 6 et 7. Les courbes de la fig. 5 montrent que les filtrats de culture renferment une ou des substances liquéfiant la C.M.C. Cette substance est relativement thermostable : son activité est ralentie par un chauffage de 15° à 100°C et presque totalement arrêtée après 10° à 120°C (courbes 1, 2, 3 de la figure 5). Cette substance est présentée dans les milieux de culture contenant de la C.M.C. ou des fibres de coton comme unique source de carbone. Ces filtrats de culture ne contiennent en revanche aucune polygalacturonidase.

Cet extrait à activité cellulasique se montre actif pour une zone étendue (FIG. 6) allant de pH 4 à pH 8.

Nous avons tenté d'isoler la substance responsable de cette activité cellulasique. Le filtrat d'une culture sur coton est dissout dans un tampon phosphate-citrate à pH 7 et dialysé contre ce tampon pendant une nuit.

Le dosage des protéines a été fait par la méthode de LOWRY.

TABLEAU III

Durée de la réaction enzymatique	Viscosité de la solution de C.M.C. par rapport au témoin (100 %)
1'	93 %
5'	86 %
10'	77 %
15'	71 %
30'	51 %

FIGURE 4

Augmentation des sucres réducteurs (courbe 1) et diminution de la viscosité (courbe 2)

Sucres réducteurs en $\mu\text{g/ml}$

Temps d'écoulement en secondes

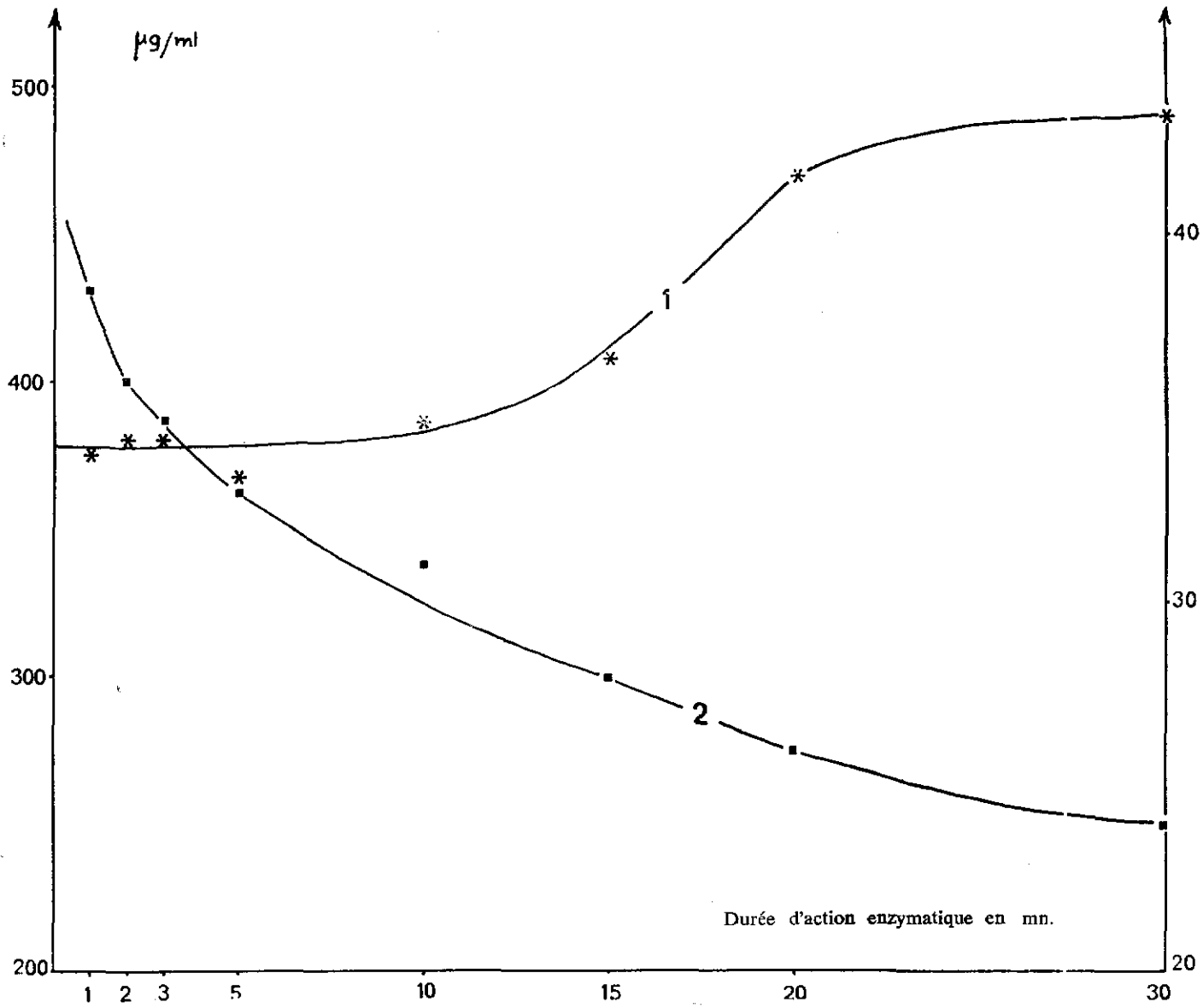


FIGURE 5

Courbe d'activité de la cellulose provenant d'un filtrat de culture sur C.M.C. à pH = 7

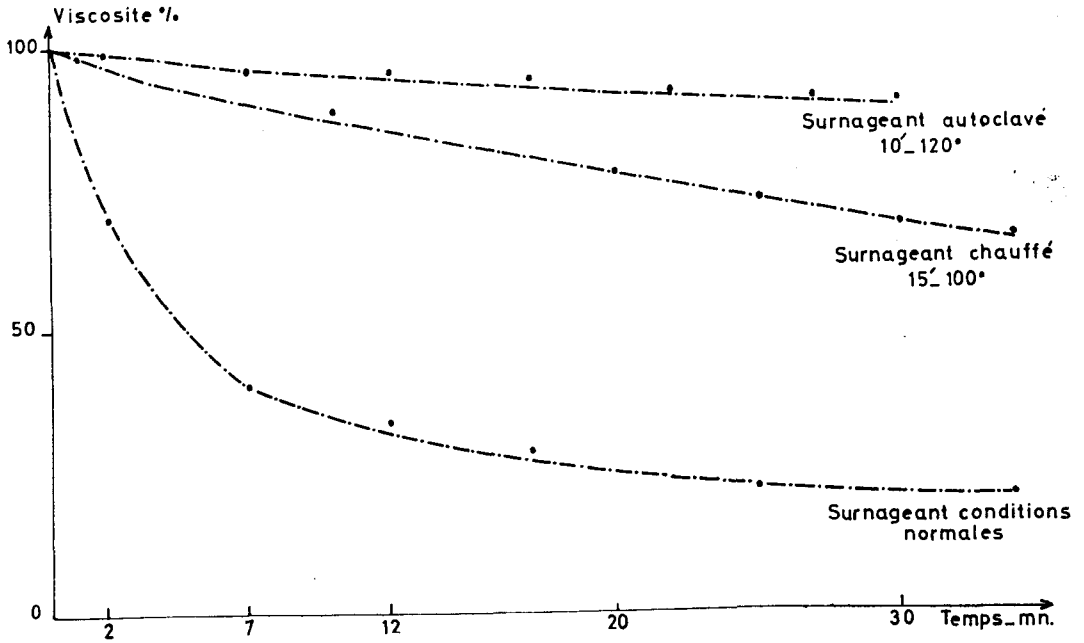
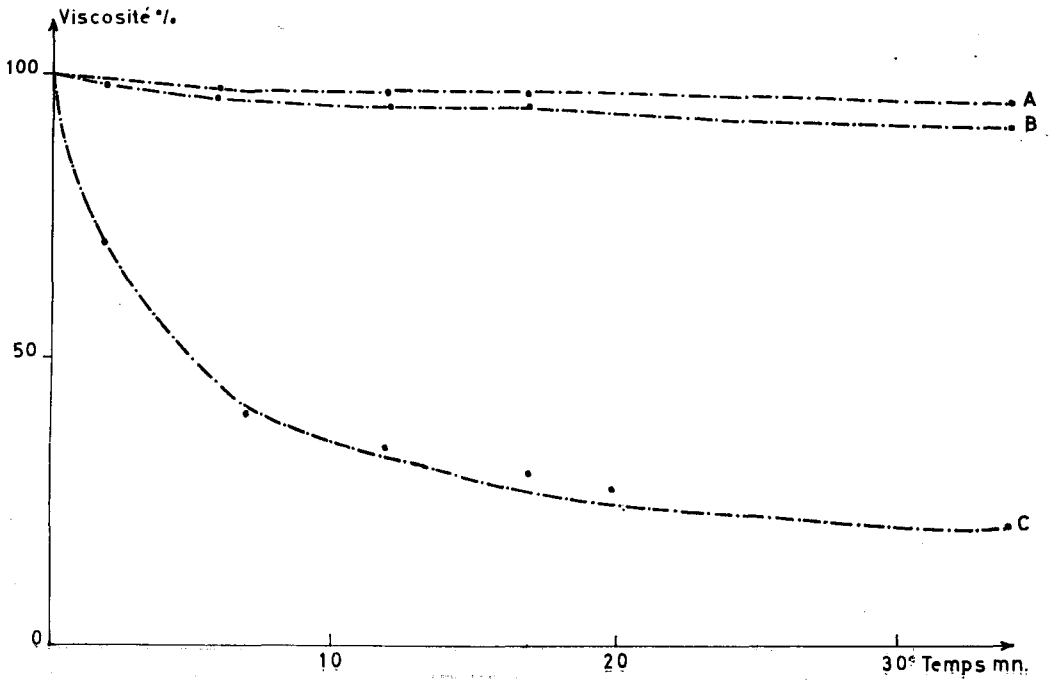
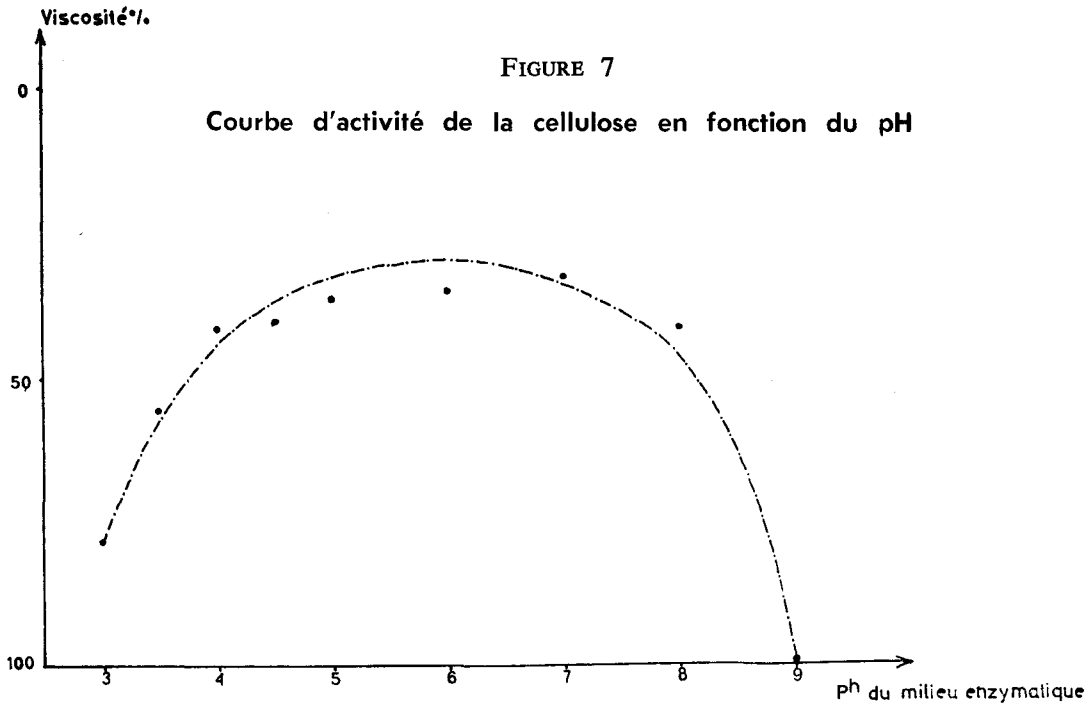


FIGURE 6

Activité de la cellulose d'un filtrat de culture sur coton à pH = 7





VII. Recherche de la nature constitutive ou adaptative des enzymes

1. Principe

La souche F5 Mol est cultivée sur 4 séries de milieux contenant comme unique source de carbone soit du glucose, soit de la pectine, soit de la cellulose, soit un mélange de pectine et de cellulose. L'activité enzymatique est recherchée dans les filtrats de ces quatre types de milieux de culture.

2. Méthodes

Les méthodes utilisées sont les mêmes que précédemment.

3. Résultats

Ils sont portés sur le tableau IV.

TABLEAU IV

Enzyme Milieu de culture	P.M.E. en ml de NaOH nécessaires pour ramener le pH à 7	Pectine glycosidase diminution de viscosité en %	Cellulase diminution de viscosité en %
Glucose	0	3	11
Pectine	5,4	60	30
Cellulose	0	0	55
Pectine Cellulose	1,6	50	56

La P.M.E. doit être considérée comme une enzyme adaptative. Elle n'est synthétisée que sur des milieux contenant de la pectine. La pectine glycosidase peut exister à l'état de traces dans les milieux au glucose.

La cellulase semble être synthétisée quelque soit la source de C. Les résultats hétérogènes sont peut être dus à la présence des deux facteurs (C 1 de solubilisation et Cx de dépolymerisation (CHARPENTIER, 1968).

VIII. Généralisation — Comparaison de différentes souches

Les tests précédents ont été répétés sur différentes souches isolées d'In-Salah ou de Ghardaia. Elles ont été choisies en fonction des types morphologiques qu'elles représentaient (MESSIAEN & CASSINI, 1968).

1. Recherche de la P.M.E.

Les résultats sont portés dans le tableau V et sont indiqués en ml de NaOH N/100 nécessaires pour ramener le pH à 7.

TABLEAU V

Type de souche	Milieu de culture			
	G	P	C	C + P
F ₅ MO ₁ pionnotal visqueux	0	5,2	0	1,6
F ₅ MO ₁ cordé	0	5,4	0	1,6
F ₅ cotonneux	0	5,1	0	1
E.A. sporodochial	0	0	0	0
E.A. sclerotial	0	0	0	0

2. Recherche de la glycosidase

Les résultats sont portés dans le tableau VI et sont indiqués en % de diminution de viscosité.

TABLEAU VI

Milieu souche	G	P	C	C + P
F ₅ MO ₁ pionnotal visqueux	3	58	0	60
F ₅ MO ₁ cordé	3	57	0	50
F ₅ cotonneux	2	69	0	58
E.A. sporodochial	0	40	0	26
E.A. sclerotial	8	25	0	10

3. Recherche des cellulases

Les résultats sont portés dans le tableau VII en % de diminution de viscosité.

TABLEAU VII

Milieu souche	G	P	C	C + P
F ₅ MO ₁ pionnotal visqueux	—	—	41	36
F ₅ MO ₁ corde	10	65	55	60
F ₅ cotonneux	21	—	48	58
E.A. sporodochial	14	—	56	55
E.A. sclerotial	22	45	45	45

Les différentes souches ont le même comportement vis-à-vis de la pectine et de la cellulose. Les trois souches F₅, morphologiquement distinctes ont une activité comparable, sinon identique. Les souches E. A., d'une autre origine et dont nous n'avons pas testé la virulence, semblent avoir une activité enzymatique plus faible.

Conclusion

L'étude in vitro du *Fusarium oxysporum* f.s. *albedinis* montre que ce parasite possède les systèmes enzymatiques nécessaires à l'hydrolyse de la pectine et de la cellulose. Les caractérisations que nous avons pu effectuer sont encore insuffisantes pour placer ces enzymes dans la classification de BATEMAN & MILLAR. Ce travail est en cours.

Nous devons dans une dernière étape rechercher ces enzymes dans les plantes malades et comparer les résultats avec ceux que nous avons acquis.

Il nous paraît possible dans ces conditions de déterminer le rôle joué par ces enzymes au cours de la pathogénèse.

Parallèlement nous tentons de mettre au point un test de virulence précis.

Nous pourrions alors établir des corrélations entre le pouvoir enzymatique et la virulence du parasite.

ملخص

بعد بيان الدور الذي تلعبه الإكتيناز والسلياز في مفعول الفزاريوم أوكسيورم ف.ب. البدنيسي ازاء النخيل، حاول الباحثون تعيين الإنزيمات التي يمكن لارومة من منسبور الفوزاريوم أن تنتجها في أوساط الزراعة الصناعية.

RÉSUMÉ

Après exposition du rôle joué par les pectinases et les celluloses dans l'action pathogène du *Fusarium oxysporum* f.s. Albidinis vis-à-vis du palmier-dattier, les auteurs essayent ensuite de caractériser les enzymes qu'une souche monospore de *Fusarium* est susceptible de synthétiser sur des milieux de culture artificiels.

RESUMEN

Después de exponer el papel que juegan las pectinasas y las celulosas en la acción patógena del *Fusarium oxysporum* f.s. Albidinis respecto a la palma datilera, los autores ensayan a continuación de caracterizar las enzimas que es susceptible de sintetizar una cepa de monospora de fusarium sobre los medios de cultivo artificiales.

SUMMARY

After having exposed the part played by the pectinase and the cellulase in the pathogenic action of *Fusarium oxysporum* f.s. Abidi-

nis with regard to the palm date trees, the authors tried to characterise the enzymes that a monospore stump of fusarium is susceptible to synthesise by means of an artificial culture.

BIBLIOGRAPHIE

- BATEMAN, D.F. — 1966. Hydrolytic and trans-eliminative degradation of pectic substances by extracellular enzymes of *Fusarium Solani* f. *phaseoli*. — *Phytopathology*, **56**, pp. 238-244.
- BATEMAN, D.F. & R.L. MILLAR. — 1966. Pectic enzymes in tissue degradation. — *Ann. Rev. Phytopathology*, **4**, pp. 119-146.
- BOUNAGA, Nicole. — 1970. Quelques aspects de la physiologie d'une souche de *Fusarium oxysporum* f.s. *albedinis*, agent de la maladie du Bayoud. — D.E.S., Fac. Sciences Alger, 66 p. dactylographiées.
- BULIT, J., J. LOUVET, D. BOUHOT & G. TOUTAIN. — 1967. Recherches sur les Fusarioses. I. Travaux sur les Fusarioses. I. Travaux sur le Bayoud, Fusariose du palmier dattier en Afrique du Nord. — *Ann. Epiphyties*, **18**, (2), pp. 213-239.
- CHARPENTIER, Madeleine. — 1968. Dégradation de la cellulose dans le sol. Mécanismes enzymatiques. — Rapport général, *Ann. Inst. Pasteur*, **115**, (4), pp. 497-537.
- HUSAIN, A. et A. KELMAN. — 1958. The role of pectic and cellulolytic enzymes in pathogenesis by *Pseudomonas solanacearum*. — *Phytopathology*, **48**, pp. 377-86.
- MANN, B. — 1962. Role of pectic enzymes in the *Fusarium* wilt syndrome of tomato. — *Trans. Brit Mycol Soc.* **45**, pp. 169-178.
- M.C., INTYRE, G.A. — 1965. Absence of pectic plugs in tomato cuttings treated with polygalacturonase of *Verticillium albo-atrum*. — *Phytopathology*, **55**, pp. 1967, (Abstr.).
- MATTA, A. et A.E. DIMOND. — 1963. Symptoms of *Fusarium* wilt in relation to quantity of fungus and enzyme activity in tomato stems. — *Phytopathology*, **53**, pp. 574-578.
- MESSIAEN, C.M. et R. CASSINI. — 1968. Recherches sur les Fusarioses IV. La systématique des *Fusarium*. — *Ann. Epiphyties*, **19**, (3), pp. 387-454.

- SAUB, Anne-Marie. — 1963. Extraction identification et dosage des glucides dans les extraits d'organes et les corps bactériens. — in J. LOISELEUR, Techniques de Laboratoires, T.I., fasc. 2, 1490 p., Ed. Masson Paris, 1963.
- WAGGONER, P.E. et A.E. DIMOND. — 1955. Production and of extra-cellular pectic enzymes of *Fusarium oxisporum* f. s. *lycopersici*. — Phytopathology, 45, pp. 79-87.
- WOOD, R.K.S. — 1960. Pectic and Cellulolytic enzymes in plant disease. — Ann. Rev. Plant. Physiol., 11, pp. 299-322.
- 1967. Physiological plant pathology. — 570 p., Blackwell, Scientific Publications, Oxford.

* Produits Flua, Buchs, Suisse