

PHYTOPATHOLOGIE. — *Enzymes pectinolytiques de souches de Phytophthora de Bary, parasites de cultures tropicales*. Note (\*) de MM. Bernard Trique et André Ravisé, présentée par M. Roger Heim.

Une souche de *P. palmivora* et une de *P. parasitica* élaborent en présence d'un inducteur des lyases dépolymérisant les matières pectiques. L'induction de leur synthèse peut se réaliser en plusieurs étapes, indépendamment de l'âge et de l'état du thalle ainsi que de la teneur en glucose dans le milieu de culture. L'activité de ces deux groupes de lyases est liée à la présence d'ions calcium.

Les souches de plusieurs espèces de *Phytophthora* parasites de cultures tropicales diffèrent entre elles par leurs aptitudes parasitaires envers certains hôtes, en particulier la tomate (<sup>13</sup>). Ces caractéristiques stables dans le temps et apparemment indépendantes des exigences nutritives de l'agent pathogène nous ont incités à étudier les enzymes pectinolytiques de deux de ces souches.

MATÉRIEL ET TECHNIQUES. — La souche I, de *P. palmivora* (Butl.) Butl., a été isolée sur aubergine en Côte-d'Ivoire et provient de la mycothèque du centre ORSTOM d'Abidjan. Elle est fortement pathogène pour douze plantes hôtes. La souche II, de *P. parasitica* Dastur, isolée à l'île Maurice sur *Nigella damascina* a été fournie par le laboratoire de Phytopathologie de l'INRA à Clermont-Ferrand. Elle est moins pathogène que la précédente sauf pour certaines variétés de tabac et de coton.

Tous les essais furent réalisés en milieu synthétique liquide précédemment décrit (<sup>12</sup>) dans lequel furent incorporés soit des pectines à 1 %, soit des tissus de plantules de tomate. Les cultures ont été effectuées à 30 °C dans des fioles coniques de 250 ml, contenant 75 ml de milieu, constamment agitées. En fin d'expérience, les milieux de culture étaient filtrés sur «nylon» et conservés à 4 °C.

L'activité enzymatique des filtrats fut éprouvée sur cinq substrats de méthylation décroissante : pectine ruban brun (S 1, 95 %), citrus pectine (S 3, 85 %), pectine ruban rouge (S 2, < 75 %), polypectate de sodium (S 4) et acide polygalacturonique (S 5). Ceux-ci furent incorporés à  $250 \cdot 10^{-6}$  dans le milieu réactionnel contenant du  $\text{CaCl}_2$  à 1 mM et tamponné avec du tris HCl,  $5 \cdot 10^{-2}$  M, à pH 8,5.

La dégradation des substrats fut déterminée par trois méthodes complémentaires : en viscosimétrie, en spectrophotométrie par l'accroissement de l'absorption entre 230 et 235 nm corrélatif à la formation de doubles liaisons et par la densité optique entre 480 et 560 nm après traitement par l'acide thiobarbiturique (ATB) indiquant la libération de groupes réducteurs [(<sup>3</sup>), (<sup>5</sup>), (<sup>11</sup>), (<sup>16</sup>)].

RÉSULTATS. — Les deux souches éprouvées produisent *in vitro* deux groupes d'enzymes pectinolytiques. Les tests de viscosimétrie et d'absorption soit en ultraviolet soit avec l'ATB (*fig. 1*) tendent à indiquer que ces enzymes sont des lyases. L'une dégrade des substrats fortement méthylés, il s'agit d'endopectine lyase — endo PTE (EC. 4.2.2.3). L'autre attaque l'acide polygalacturonique et faiblement son sel de sodium, c'est une endopectate lyase — endo PATE (EC. 4.2.2.1).

La synthèse de ces enzymes est adaptative. Les deux souches ne produisent pas de lyase en l'absence de pectines ou d'acides pectiques. Sans sels de calcium cette sécrétion est extrêmement faible, l'incorporation de  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  à 1 mM rétablit les synthèses à un taux élevé (tableau 1).

Il semble exister plusieurs niveaux de production des lyases, indépendants de l'âge et de l'organisation du thalle, suivant la nature de l'inducteur incorporé au milieu de culture (tableau 2).

En présence de pectines seules, les deux types d'enzymes sont synthétisés, toutefois la croissance étant réduite en l'absence de glucides, les activités sont faibles. L'incorporation d'extrait de plantules de tomate stérilisé par filtration sur

21 JAN. 1972  
O. R. S. T. O. M.

Collection de Référence

n° 5484 Phyto

« millipore », correspondant à 330 mg de tissus frais pour 100 ml de milieu contenant des pectines, ne modifie pas la synthèse des enzymes. Par contre, l'adjonction de fibres écrues — 53 mg pour 100 ml de milieu — provenant de ces mêmes tissus accroît la synthèse d'enzymes, surtout de l'endo PATE. L'apport de tige de tomates — 270 mg de tissus frais pour 100 ml — stérilisées *in situ*, donc avec toutes leurs substances pectiques, stimule la synthèse, également chez les deux souches, même en présence de glucose. Dans ce cas, la production des deux groupes d'enzymes devient aussi importante qu'au contact de tissus vivants.

Tableau 1. - Influence du calcium sur l'activité des lyases libérées par la souche I en 96 heures de culture dans un milieu à 1 % de pectines et 1 % de glucose.

Essais	Substrats				
	S 1	S 2	S 3	S 4	S 5
sans calcium	0	0	9	8,4	1,5
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> , 1mM	8,4	19,6	3	28,5	53,2

Tableau 2. Influence de deux inducteurs sur l'activité des lyases libérées par la souche I en 96 heures de culture dans un milieu à 1 % de pectines.

Milieu	Substrats				
	S 1	S 2	S 3	S 4	S 5
sans glucose	35	0	42	21	21
avec glucose 1% et fibres écrues à 530 ppm	27,5	0	54,5	53	9
avec glucose 1% et tiges stérilisées à 0,25%	75,9	109	131,8	47,2	116,2

Variations de l'absorption à 232 nm, rapportées à 1 mg de protéines dans le mélange réactionnel.

Enfin au milieu de culture contenant seulement du glucose à 1 %, l'incorporation de fibres écrues — correspondant à 250 mg de tissus frais pour 100 ml — déclenche la synthèse d'endo PATE, tandis que celle des deux enzymes l'est, à la même concentration, par des fragments de tiges stérilisés à 110 °C.

Les délais d'induction sont courts. *In vitro*, avec un implant correspondant à moins de 0,1 mg de mycélium sec, l'activité lyase est décelable entre 36 et 48 h après l'ensemencement. Elle est dosable 24 h après l'incorporation d'inducteur à des cultures de 4 jours. Enfin, lors des inoculations expérimentales sur plantules de tomate, une importante activité apparaît en moins de 12 h, même en présence de glucose, avec des thalles âgés d'une à trois semaines finement dilacérés avec un broyeur « ultra-turrax ». Presque toujours, l'élaboration d'endo PTE est plus importante que celle d'endo PATE.

Les deux types de lyases possèdent plusieurs caractéristiques communes. Lors de dialyses prolongées ou d'essais de concentration contre du polyéthylène glycol, elles perdent leur activité, cette dernière semble, au moins en partie, associée à la présence d'ions Ca<sup>++</sup>.

Ces enzymes sont inactivées par chauffage pendant 15 mn à 50 °C, alors que les extraits incubés à 45 °C possèdent les mêmes caractéristiques que les témoins non traités. La conservation à - 20 °C, même en appliquant des techniques de congélation et de réchauffage modérées, détruit presque toujours leur activité contrairement aux lyases du *Fusarium roseum* f. *avenaceum* (<sup>11</sup>).

Le pH optimal de l'endo PATE est voisin de 6, celui de l'endo PTE de 7,5. Leur gamme d'activité s'étend de pH 4,5 à 9,5 avec une plus grande intensité entre les pH 6 et 8,5 (fig. 2).

Dans de nombreux essais réalisés avec des extraits enzymatiques obtenus au

contact d'inducteur végétal, les mesures spectrophotométriques après traitement à l'ATB révèlent l'existence d'un épaulement entre 525 et 530 nm. Un profil analogue est mentionné sans interprétation par Sherwood <sup>(15)</sup> dans une étude sur l'action conjuguée de lyase et de polygalacturonase sur tissus de pomme de terre. Par révélation des thiobarbiturates, la présence de taches caractéristiques de radicaux « désoxy- » est décelée dans la zone des oligogalacturonides sur des chromatographies en couche mince de cellulose.

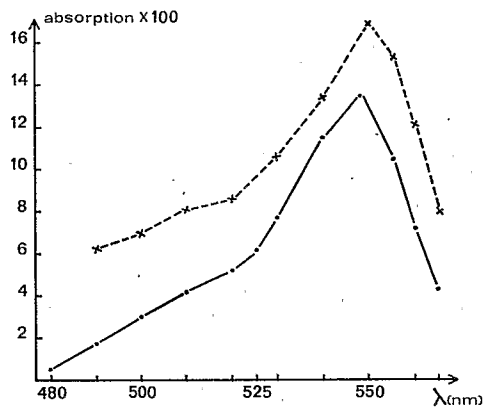


Fig. 1

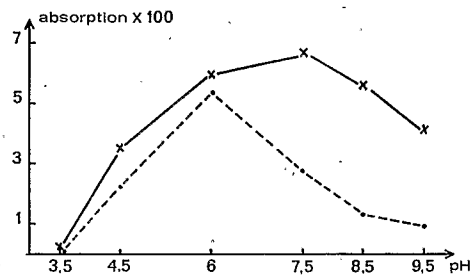


Fig. 2

Fig. 1 (à gauche). — Spectre des produits de dépolymérisation des pectines par la souche I après réaction à l'ATB. Trait plein : pectines + glucose ; pointillé : pectines + glucose + inducteur végétal.

Fig. 2 (à droite). — Courbes d'activité pectinolytique pour la souche I en fonction du pH. Trait plein : endo PTE ; pointillé : endo PATE.

DISCUSSION. CONCLUSIONS. — La présente étude a révélé l'existence de lyases chez le *P. palmivora* et le *P. parasitica*. Antérieurement, plusieurs auteurs [(1), (10)] avaient présumé l'existence d'endopolygalacturonase et de pectine-méthylestérase chez les *Phytophthora*. Ces deux enzymes ne furent pas décelées au cours de nos essais. Par contre, nous venons d'apprendre l'existence d'une lyase chez le *P. rubra* (9).

Les recherches récentes sur l'équipement pectinolytique de champignons et de bactéries phytopathogènes mettent en évidence que la dégradation des tissus de l'hôte par des pectines transéliminases est fréquente. Celles-ci attaquent les substances pectiques, soit seules [(3), (5), (9), (11)], soit associées à des polygalacturonases (15).

Les deux souches synthétisent simultanément de l'endo PTE et de l'endo PATE. Plusieurs auteurs estiment que ces enzymes ont une action complémentaire, l'endo PATE contribuant à l'altération initiale des structures (6). L'association des deux enzymes pourrait justifier le polyphytisme des *Phytophthora* étudiés. En outre, les épaulements décelés à 525 nm dans des essais à l'ATB ainsi que les réactions positives obtenues avec les tests à la diéthylamine cuprique et au nitrate d'argent ammoniacal (14) laissent présumer l'existence d'une oligogalacturonate lyase (4). Elle pourrait dégrader, à la suite des deux autres lyases, des oligogalacturonates insaturés suivant le processus décrit par Hatanaka et Ozawa avec formation d'un acide désoxyuronique.

L'induction de la synthèse des lyases semble se réaliser en plusieurs étapes. En présence de pectines solubles, les teneurs en enzymes sont faibles. L'apport de matériaux de nature pectique, même à très faible dose, stimule largement la sécrétion enzymatique : les fibres écrues seulement d'endo PATE ; les structures non lessivées, des deux lyases. La présence de glucose, même dans la proportion de 4/1 par rapport au poids de tissus frais incorporés dans le milieu de culture, n'influe pas sur cette induction enzymatique. Ces résultats sont différents de ceux obtenus avec d'autres parasites [(2), (7)], mais concordent avec des observations récentes sur le *Fusarium oxysporum* f. sp. *elaeidis* (17).

L'aptitude à synthétiser des lyases est indépendante de l'âge des thalles. En présence d'inducteur, elle ne semble pas limitée à une courte période comme celle d'autres enzymes du *P. palmivora* (1). Il existe une étroite similitude avec seulement des différences quantitatives, entre les deux souches appartenant à des espèces distinctes, originaires de régions et d'hôtes très éloignés. Elles ont conservé leur potentialité après un long séjour en mycothèques.

Les lyases de ces *Phytophthora* ressemblent par deux caractères à celles d'autres parasites. Leur activité ne s'exprime qu'en présence d'ions  $Ca^{++}$  [(3), (5), (11)] ; une seule oligopectate lyase échappe à cette situation (4). Les aptitudes à dégrader les substrats en fonction du pH sont proches [(3) à (5), (9)]. L'altération des substances pectiques par ces enzymes est favorisée par une réaction faiblement acide ou alcaline voisine de celle de la plupart des tissus de plantules. Toutefois l'activité réduite des lyases en milieu acide rend les souches de *Phytophthora* inaptes à attaquer certains organes, fruits immatures ou collets de plantules en sols acides [(8), (18)] ; ceci tend à expliquer le succès de certaines techniques de protection de cultures, en particulier de *Piper nigrum* et de tabac.

(\*) Séance du 11 octobre 1971.

- (1) O. A. AKINREFON, *Ann. appl. Biol.*, 63, 1969, p. 303-313.
- (2) W. L. BIEHN et A. E. DIMOND, *Phytopathology*, 60, 1970, p. 1284.
- (3) A. GARIBALDI et D. F. BATEMAN, *Phys. Plt. Path.*, 1, 1971, p. 25-40.
- (4) C. HATANAKA et J. OZAWA, *Agr. Biol. Chem.*, 34, 1970, p. 1618-1624.
- (5) P. KAISER, *Comptes rendus*, 272, Série D, 1971, p. 501-504.
- (6) A. L. KARR jr et P. ALBERSHEIM, *Plant Physiol.*, 46, 1970, p. 69-80.
- (7) N. T. KEEN et D. C. ERWIN, *Phytopathology*, 61, 1971, p. 198-203.
- (8) R. R. KINCAID et coll., *Phytopathology*, 60, 1970, p. 1513-1516.
- (9) J. M. MANTRI et K. B. DESHPANDE, *Abst. Mycol.*, 5, 1971, p. 351.
- (10) L. D. MOORE, *Phytopathology*, 60, 1970, p. 1016-1017.
- (11) J. F. MULLEN et D. F. BATEMAN, *Phys. Plt. Path.*, 1, 1971, p. 363-373.
- (12) A. RAVISÉ, *Comptes rendus*, 267, Série D, 1968, p. 1821-1824.
- (13) A. RAVISÉ et J. TANGUY, *Comptes rendus*, 272, Série D, 1971, p. 1252-1255.
- (14) L. D. SASLAW et V. S. WARAVDEKAR, *Methods in Enzymology*, 12 A, 1967, p. 108-113.
- (15) R. T. SHERWOOD, *Phytopathology*, 56, 1966, p. 279-286.
- (16) B. TRIQUE, *Oléagineux*, 26, 1971, p. 164-168.
- (17) B. TRIQUE, *Oléagineux*, 26, 1971, p. 563-565.
- (18) G. J. TURNER, *Trans. Brit. Mycol. Soc.*, 52, 1968, p. 419-423.

Laboratoire de Biologie Végétale,  
Faculté des Sciences, 29 N-Brest, Nord-Finistère ;  
Office de la Recherche Scientifique et Technique Outre-Mer.