

## THESIS / THÈSE

### MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES

#### Influence de la nature des pectines de *Solanum tuberosum* sur les mécanismes de résistance à la macération par *Erwinia carotovora* pv *atroseptica*

Simon, Isabelle

*Award date:*  
1991

*Awarding institution:*  
Universite de Namur

[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.

**Influence de la nature des pectines de *Solanum tuberosum* sur la résistance à la macération tissulaire par *Erwinia carotovora* pv *atroseptica*.**

SIMON Isabelle

Résumé

*Erwinia carotovora* pv *atroseptica* (Eca) est une bactérie phytopathogène caractérisée par la synthèse d'enzymes à forte activité pectolytique responsables de la macération des tissus infectés.

Par la technique du marquage immunologique en microscopie électronique, nous avons étudié le degré d'estérification (DE) des pectines de *Solanum tuberosum*. L'utilisation de deux cultivars, Alpha et Charlotte, caractérisés par des sensibilités différentes à Eca, nous a permis de corrélérer un contenu élevé en pectines fortement méthylestérifiées avec la résistance au pathogène. De telles caractéristiques, typiques du cultivar moins sensible (Alpha), permettent de retarder l'apparition des symptômes de la pourriture humide. Celle-ci est néanmoins inévitable, Eca déméthylant les polymères pectiques alors sujets à la  $\beta$ -élimination par la pectate lyase.

De plus, nous avons observé la libération par les tiges du cultivar résistant, de composés absorbant dans l'UV proche, susceptibles de participer aux moyens de défense du végétal.

Mémoire de licence en Sciences Biologiques

Septembre 1991

Promoteur : Prof. P. VAN CUTSEM

Ce mémoire n'a pu être réalisé qu'avec le concours de plusieurs personnes auxquelles je tiens particulièrement à exprimer ma reconnaissance.

Je remercie avant tout le professeur P. Van Cutsem, promoteur de ce mémoire qui m'a accueillie dans son laboratoire et suivie tout au long de ce travail.

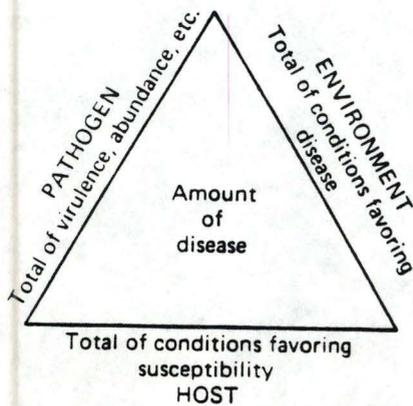
J'adresse également mes remerciements au professeur Ph. Lepoivre de la Faculté des Sciences Agronomiques de Gembloux, qui a orienté nos recherches.

Toute ma gratitude aux membres de l'équipe du laboratoire: Johan, Peter, Albert, Michel, Pierre, et plus particulièrement à Françoise. Leur disponibilité constante, leurs conseils judicieux et leur accueil chaleureux m'ont été très précieux.

Merci également à Christine et Carole pour leur présence stimulante et leur bonne humeur coutumière.

Ma vive gratitude à Chantal Devignon pour son soutien et sa très appréciable aide technique.

Et enfin, plus personnellement, je tiens à remercier ma famille pour l'aide morale et pratique qu'elle m'a apporté tout au long de cette année.



Each side of the triangle represents one of the three components. The size each side is proportional to the sum total of the characteristics of each component that favor disease. If the three components of the disease could be quantified, the area of the triangle would represent the amount of disease plant.

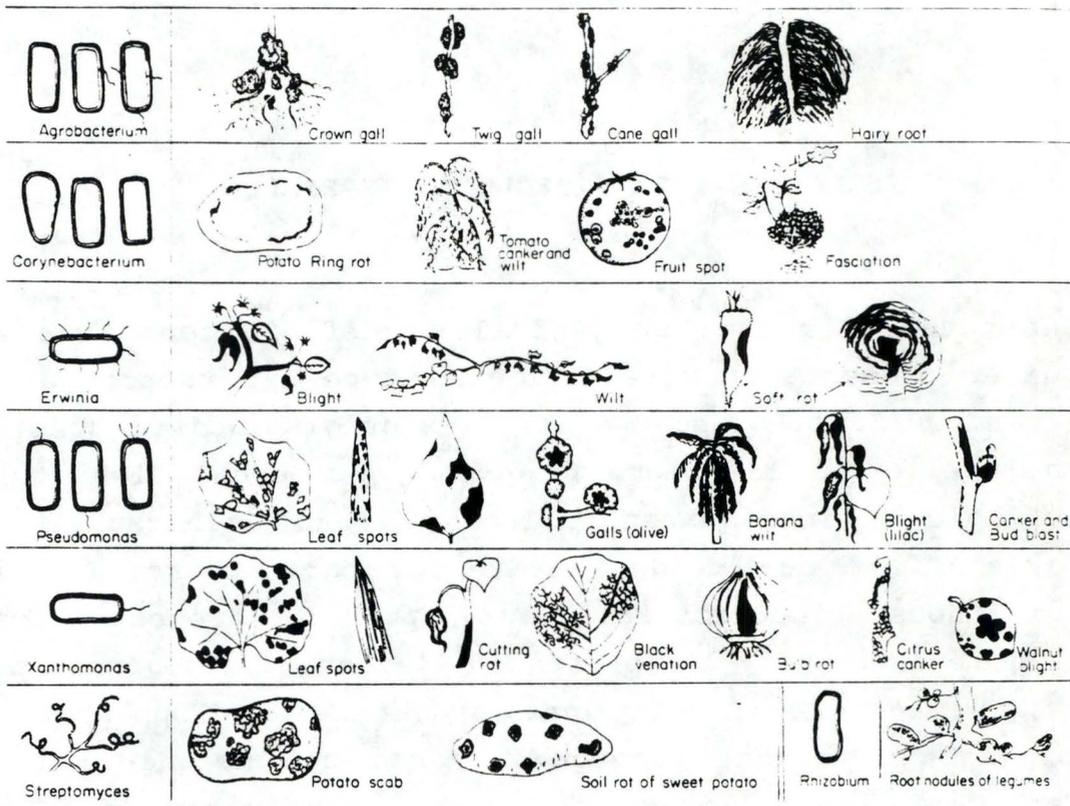
FIGURE 1

## I. INTRODUCTION

### 1- GENERALITES : LA PATHOLOGIE VEGETALE

Une pathologie chez un végétal se définit comme une anomalie qui se présente au niveau du phénotype par rapport à la norme attendue. Celle-ci peut avoir deux origines distinctes:

La première, la plus fréquente, comprend les conditions écologiques inadéquates ( lumière, eau, minéraux ... ), on parlera dans ce cas de maladie non parasitaire. La seconde, qui nous intéressera plus particulièrement ici, est caractérisée par la présence d'agents pathogènes parasites (virus, bactéries, champignons ) qui se développent aux dépens du végétal vivant, provoquant ainsi une maladie parasitaire. Cependant, même dans ce cas, l'influence des facteurs environnementaux est prépondérante. En effet, si au moment du contact plante-pathogène les conditions extérieures sont défavorables à l'attaque du pathogène et/ou favorables à la capacité de résistance de la plante, alors, la maladie ne pourra pas se développer. Ainsi ce ne sont pas deux mais trois facteurs qui entrent en jeu lors du développement de la maladie chez la plante : le pathogène, le végétal et l' environnement. Les interactions entre ces trois composantes peuvent être visualisées sous forme d'un triangle (the disease triangle) dont la taille de chacun des côtés est proportionnelle à la somme des caractéristiques favorables à la maladie, la surface du triangle ainsi déterminée représentant la quantité de maladie. (voir figure 1)



**FIGURE 2** Genera of bacteria and the kinds of symptoms they cause.

## 2- LES PATHOLOGIES D'ORIGINE BACTERIENNE

On trouve les maladies bactériennes dans tous les endroits où l'humidité et la chaleur sont suffisantes et cela concerne pratiquement toutes les espèces végétales. Si les conditions sont particulièrement favorables, les bactéries pourront occasionner des dégâts très importants.

On connaît aujourd'hui plus de 1500 espèces de bactéries. Parmi elles, environ 80 sont responsables de maladies chez les plantes. Elles sont la cause de pathologies diverses et appartiennent à 7 genres différents: *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas*, *Xanthomonas*, *Streptomyces* et *Rhizobium* (voir fig 2).

Une majorité d'entre elles se présente sous forme de bâtonnet avec ou sans flagelle, les autres étant sous forme filamenteuse ( *Streptomyces* )

## 3- LES RELATIONS HOTE-PATHOGENE

Il est nécessaire avant tout de distinguer les espèces hôtes des espèces non hôtes. Ces dernières sont caractérisées par une incompatibilité fondamentale entre la plante et le pathogène. Celui-ci n'a pas, dans ce cas, la possibilité de croître et d'infecter la plante (les mécanismes de défense de la plante sont mis en jeu avant même que le parasite ne se développe).

Par contre, si le végétal correspond à une espèce hôte, une relation pourra s'établir via des interactions spécifiques déclenchées par l'intervention de signaux moléculaires (très peu connus). Dans ce cas, selon que le pathogène échappe aux mécanismes de surveillance (la maladie pouvant se développer) ou n'y échappe pas (la reconnaissance du parasite étant réalisée assez tôt et suivie d'une réponse de défense), on parlera de réaction compatible ou incompatible.

Ainsi peut-on caractériser la plupart des micro-organismes pathogènes par les relations qu'ils entretiennent avec leur(s) hôte(s), relations dont le type est déterminé par les phénomènes de reconnaissance, tout en n'oubliant pas les impératifs écologiques requis pour la réalisation de l'infection (humidité relative élevée par exemple).

#### 4- LES BACTERIES, AGENTS DE LA POURRITURE HUMIDE

Il existe quelques bactéries capables d'attaquer des tissus végétaux vivants (au champ ou pendant le stockage) en provoquant leur pourriture. Ces bactéries appartiennent à deux genres différents: *Pseudomonas* et *Erwinia*. Ces dernières étant les plus communes et les plus destructrices.

Les *Erwinias* sont des bactéries phytopathogènes qui appartiennent à la famille des Entérobactériacées, leurs principales caractéristiques sont les suivantes :

- . gram -
- . anaérobie facultative
- . forme de bâtonnet
- . flagelles péritriches

Les espèces de ce genre forment un ensemble très hétérogène et ont été divisées en 4 groupes:

- *atypiques*: non pathogènes
- *E.amylovora*: provoquant des nécroses sèches et le flétrissement des plantes qu'elles infectent.
- *E.herbicola*: comprend les espèces caractérisées par la production d'un pigment jaune (caroténoïde). Elles s'associent aux plantes comme opportunistes ou épiphytes.
- *E.carotovora*: comprend les espèces caractérisées par de fortes activités pectolytiques induisant la macération des tissus (pourriture humide).

On distingue 3 sous-espèces :

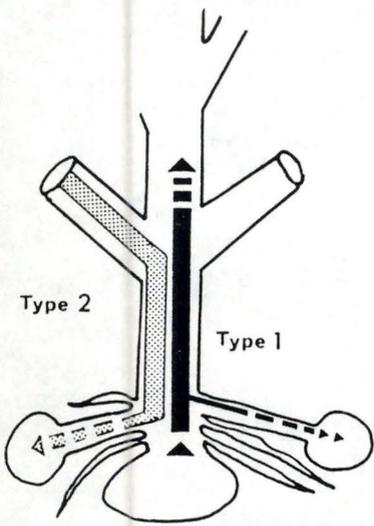
- E.carotovora* pv *carotovora* (Ecc)
- E.carotovora* pv *atroseptica* (Eca)
- E.chrysanthemi* (Ech)

Ecc est responsable de la pourriture molle tout comme Eca qui semble n'être rien d'autre qu'un variant de Ecc adapté aux températures plus basses.

La maladie la plus importante causée par le groupe des *carotovora* est la pourriture de la pomme de terre (*Solanum tuberosum*) pouvant atteindre le tubercule ou la tige.

La bactérie pénètre dans les tubercules essentiellement par les blessures mais, durant le stockage, des tissus non abîmés pourront être contaminés si les conditions de température et d'humidité y sont favorables.

L'infection sur le tubercule apparaît chargée d'eau (soft rot) et de couleur blanc crème .

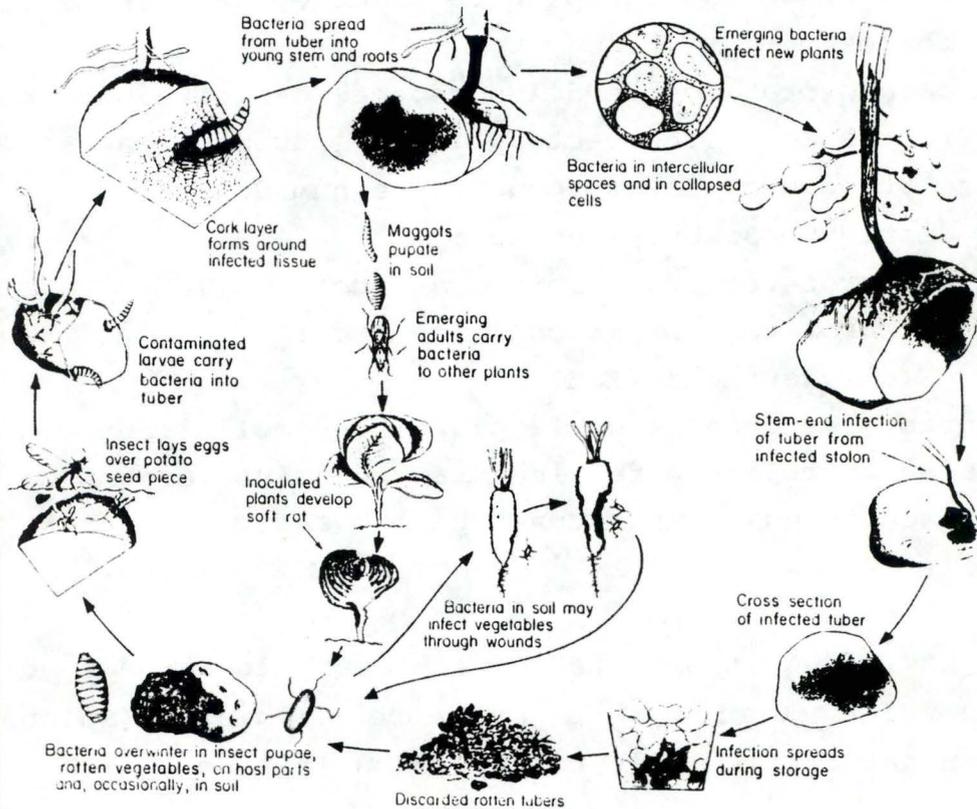


**FIGURE 3**

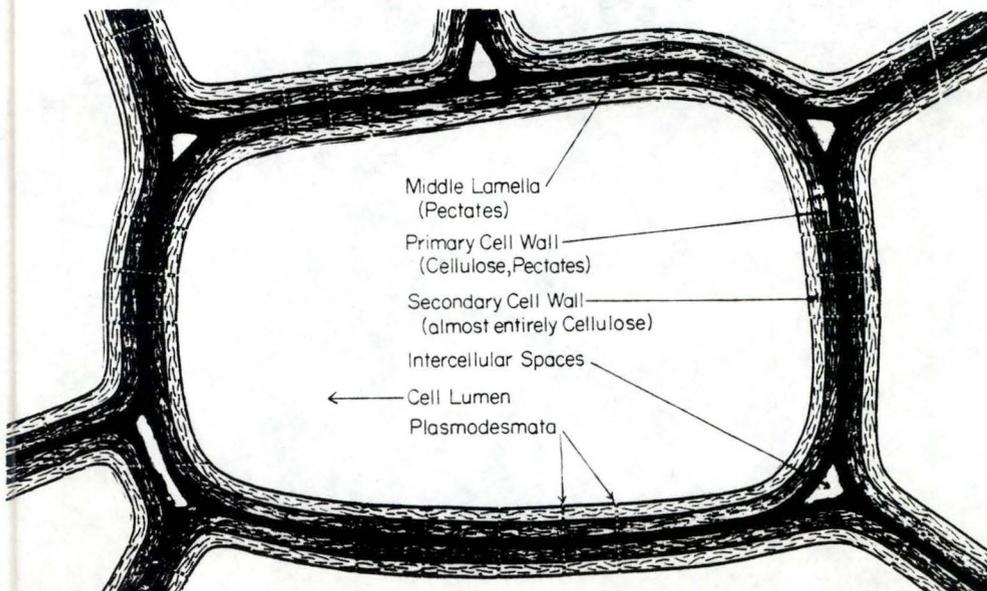
Two types of stem rots occur :

**TYPE 1 :** Stem rots with symptoms typical of those described for blackleg, arising from infected tubers.

**TYPE 2 :** Stem rots arising from injury to any point in the plant top, parts of the upper canopy or the basal stem and proceeding down to the tubers.



**FIGURE 4** Disease cycle of bacterial soft rot of vegetables caused by soft-rotting *Erwinia* sp.



**FIGURE 5** Schematic representation of structure and composition of plant cell walls.

L'infection des tiges peut s'établir de deux manières:

- . au départ du tubercule infecté
- . au départ d'une blessure située à un endroit quelconque sur la partie aérienne de la plante (de là, la bactérie pourra contaminer les tubercules).

(voir figure 3)

La tige ainsi touchée apparaît brune ou noire (black leg), les feuilles deviennent "chlorotiques" et la plante fane.

Au sein des tissus, les bactéries se multiplient dans les espaces intercellulaires et produisent des enzymes capables de détruire la paroi, entraînant la macération du tissu.

(Voir figure 4)

Mais avant de considérer les mécanismes mis en jeu lors de ce processus, il est nécessaire de rappeler la structure et la composition de la paroi végétale.

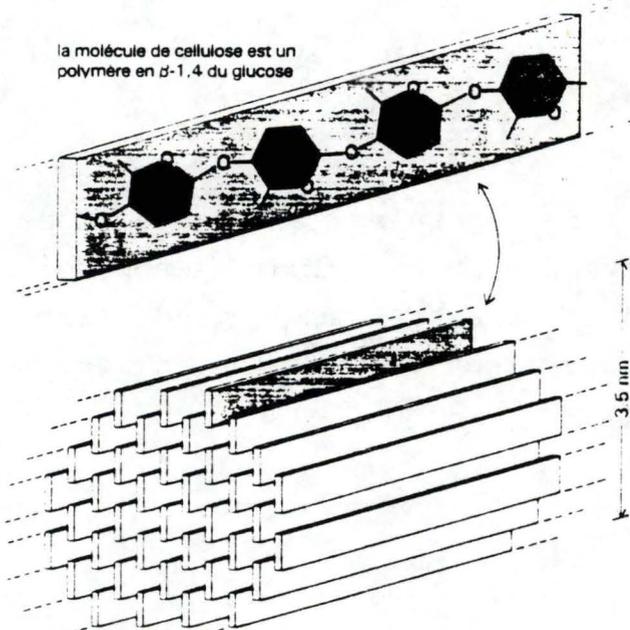
## 5- LA PAROI VEGETALE : STRUCTURE ET COMPOSITION

### A/ Structure

La paroi des cellules végétales est subdivisée en trois régions: lamelle mitoyenne, paroi primaire et paroi secondaire; le passage de l'une à l'autre se faisant graduellement. Celles-ci sont caractérisées par leur composition et leur rôle.

(voir figure 5)

la molécule de cellulose est un polymère en  $\beta$ -1,4 du glucose



l'arrangement cristallin des molécules de cellulose reliées par des liaisons transversales forme une microfibrille de cellulose

**FIGURE 6** Représentation schématique de l'organisation des molécules de cellulose dans la paroi cellulaire d'un végétal supérieur.

**La lamelle mitoyenne** : région très fine (moins de 30 nm), cimentant entre elles les cellules voisines, mais pouvant s'interrompre par endroits en ménageant des espaces intercellulaires (méats). Elle est essentiellement composée de pectines. Sa cohésion dépend essentiellement d'interactions ioniques (Bartley & Knee, 1982), avec la coopération des ions  $Ca^{++}$ . (Jarvis, 1984)

**La paroi primaire** : déposée lors de la croissance de la jeune cellule végétale, son épaisseur est maintenue constante (entre 0.1 et 1  $\mu m$ ). Elle est principalement constituée de polymères pectiques et de microfibrilles de cellulose.

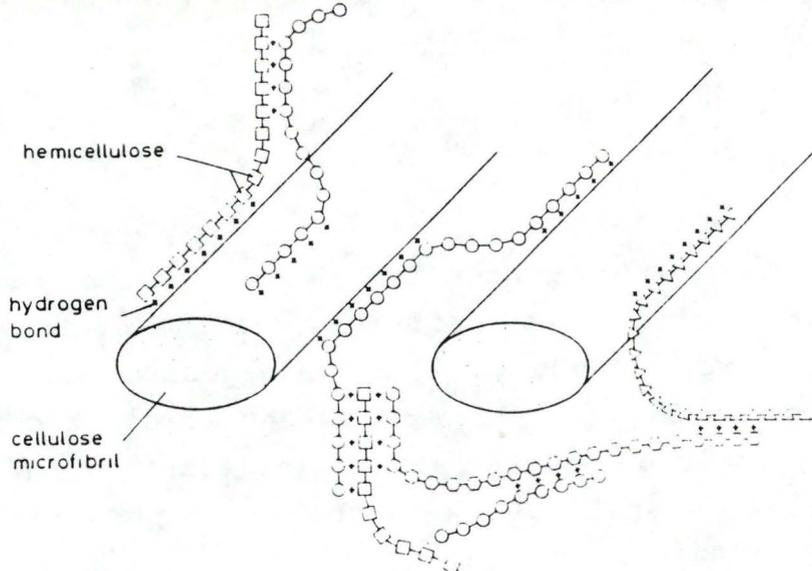
**La paroi secondaire** : mise en place alors que l'élongation cellulaire est terminée, sa nature est essentiellement cellulosique.

## B/ Composition

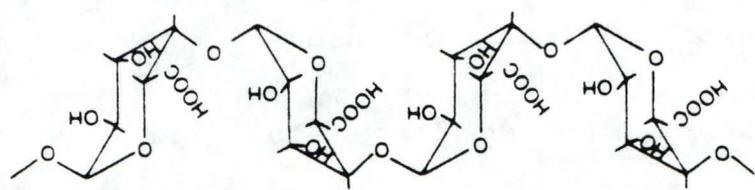
Les trois couches de la paroi cellulaire comprennent deux phases distinctes : la première microfibrillaire, constituée de microfibrilles de cellulose. La seconde, matricielle, très complexe du point de vue chimique est constituée d'une variété de polysaccharides, protéines et composés phénoliques. Sa composition varie selon la couche de la paroi, le type de cellule et son degré de maturité.

### B.1. la phase microfibrillaire

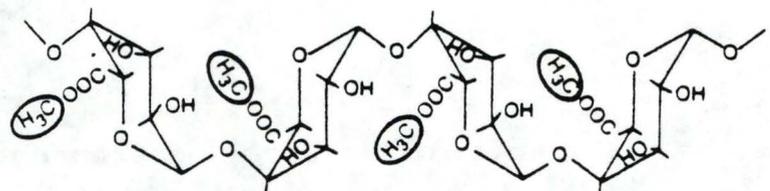
La cellulose : chaînes linéaires de glucose (lié en  $\alpha$ -1,4) reliées entre elles par des ponts hydrogènes permettant la formation d'agrégats cristallins hautement structurés : les microfibrilles. (voir figure 6)



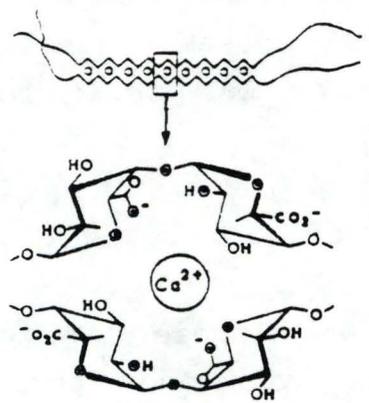
**FIGURE 7** Cell-wall model illustrating the hydrogen-bond interactions of hemicellulosic polysaccharides (-△-△-, -○-○-, -□-□-, -◇-◇-) with each other and with cellulose microfibrils. This produces a complex network of polysaccharides which contributes to maintaining the integrity of the cell wall.



**FIGURE 8** Pectate (polygalacturonate)



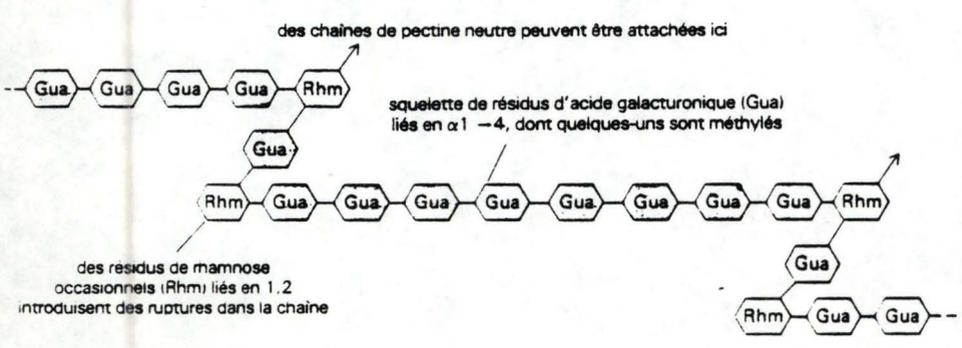
**FIGURE 9** Methyl esterified pectate



**FIGURE 10**  
ASSOCIATION DES PECTINES PAR L'INTERMEDIAIRE D'IONS CALCIUM:

MODELE EN "BOITE A OEUFS" D'APRES REES (1982)

⊙ ATOMES D'OXYGENE LIGANDS DU CALCIUM



**FIGURE 11** Exemple de molécule de pectine acide (un rhamnogalacturonane) de la paroi d'un végétal supérieur. Des ruptures dans la chaîne linéaire de résidus d'acide galacturonique chargés négativement sont introduites de temps à autre par les résidus de rhamnose.

## B.2. la phase matricielle

Composée principalement de polysaccharides difficiles à analyser chimiquement et classés selon la méthode d'extraction utilisée : hémicelluloses, pectines, protéines et lignines.

B.2.1 Les hémicelluloses : extraites par des solutions alcalines. Elles sont composées de différents sucres de types variés ( $C_4$  et  $C_5$ ) assemblés en chaînes courtes et souvent ramifiées. Très hydrophyles, elles tapissent et relient entre elles les microfibrilles de cellulose. (voir figure 7)

B.2.2 Les pectines : très susceptibles à la dégradation, même sous des conditions très douces, elles sont extraites par des acides dilués ou des agents chélatants. Ce groupe comprend des polysaccharides hétérogènes ramifiés et très hydratés. Ils ont été caractérisés en définissant plusieurs domaines structurels, le plus simple étant le domaine **homopolygalacturonane**. Celui-ci est composé de chaînes linéaires de  $\alpha$ -1,4 D-galacturonates. (voir figures 8, 9) Ces régions peuvent être méthyl-estérifiées sur les groupements carboxyliques ou être estérifiées sur les fonctions hydroxyles par l'acide acétique, ceci apparaissant moins souvent.

Les séquences homopolygalacturoniques non estérifiées peuvent s'associer en "egg box" (boîte à oeufs) par des liaisons faibles coopératives en présence de cations bivalents (préférentiellement avec le calcium). (voir figure 10)

A côté des acides galacturoniques, on trouve comme constituant de la pectine, un résidu de sucre neutre : le rhamnose (mais en quantité moindre: proportionnellement, environ 1 rhamnose pour 20 à 25 acides uroniques). Sa présence introduit des coudes dans la chaîne pectique. (voir figure 11)

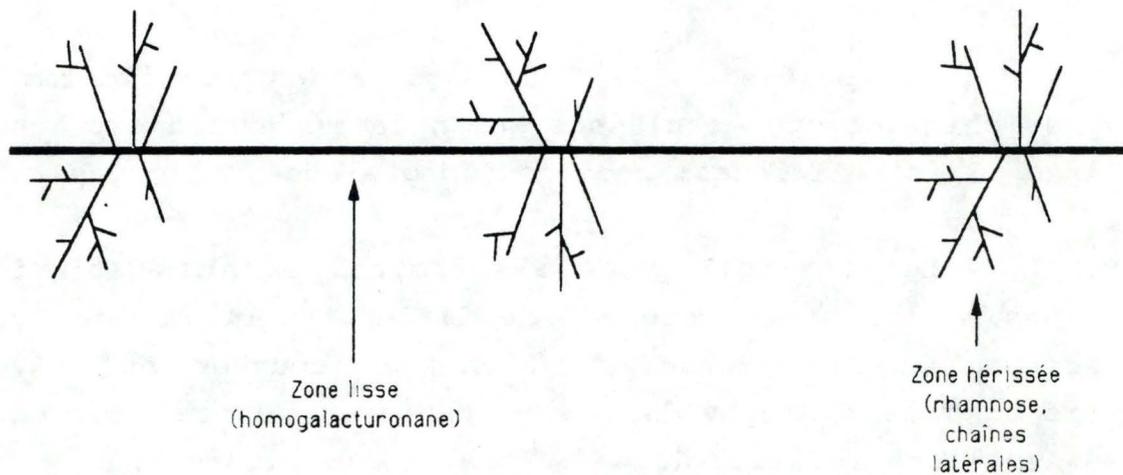


FIGURE 12 Structure des pectines.

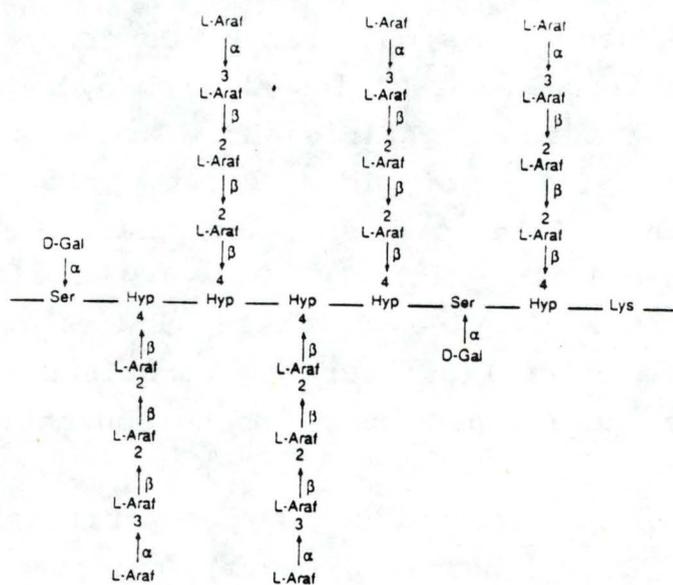


FIGURE 13 Structure chimique de l'extensine

Sont présentes également, des chaînes latérales se greffant sur le C<sub>4</sub> des résidus rhamnose mais aussi sur certains résidus d'acide galacturonique en position C<sub>3</sub>. Ces ramifications sont composées de différents polymères de sucres neutres : arabinanes, galactanes et arabinogalactanes.

Sur base de ces caractéristiques (estérification, rhamnose et chaînes latérales), un modèle concernant la structure spatiale de la pectine a été proposé. Celui-ci suggère une répartition en blocs des rhamnoses et des chaînes latérales; la pectine présentant des zones "lisses" et "hérissées". (voir figure 12) (McNeil et al, 1984; Selvendran, 1985)

B.2.3 La paroi est également composée de protéines. Parmi elles l'extensine, glycoprotéine de structure caractérisée par sa richesse en hydroxyproline (40%) dont la majorité porte des chaînes osidiques courtes (1 à 4 résidus). (voir figure 13) D'autres protéines, des enzymes telles que phosphatases, pectinases, pectine méthyl-estérases (PME) ... sont localisées dans la paroi.

B.2.4 Certains types cellulaires différenciés contiennent d'autre part des polymères d'alcools aromatiques hydrophobes, appelés lignines. Leur présence rend la paroi imperméable et les échanges de nutriments difficiles, mais elles peuvent constituer une barrière à la pénétration d'un pathogène.

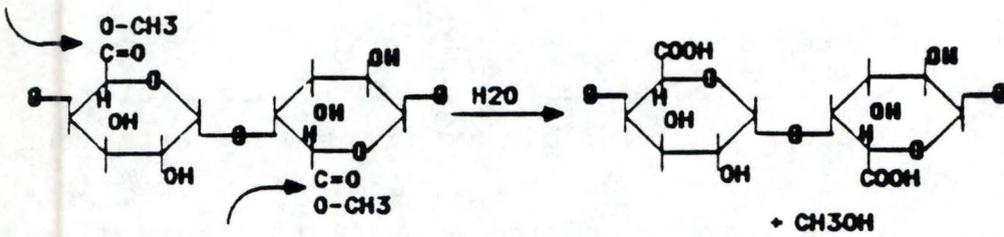


FIGURE 14 Action des pectinestérases

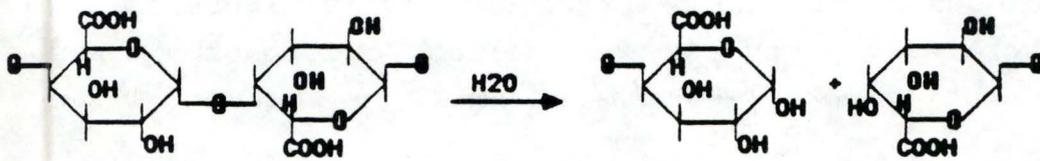


FIGURE 15 Action des polygalacturonases

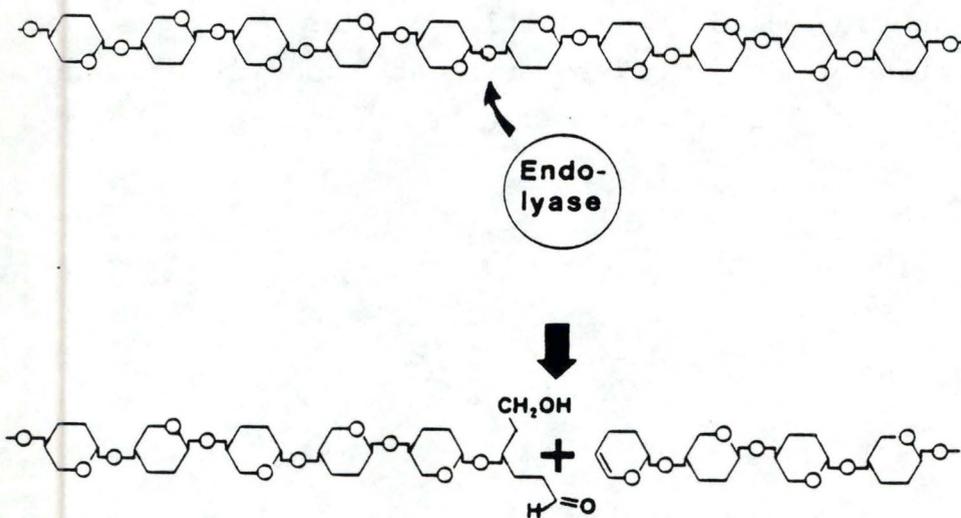


FIGURE 16 Diagram of endolyase activity.

## 6- DEGRADATION DE LA PAROI CELLULAIRE

La paroi est donc une structure complexe et ordonnée qui constitue non seulement un support pour la cellule mais aussi un obstacle à l'invasion microbienne.

Aussi, la majorité des pathogènes a développé la capacité de synthétiser des enzymes capables de détruire cette paroi : cellulases, hémicellulases, protéases et pectinases.

De nombreux travaux se sont efforcés de préciser le rôle de ces dernières dans le processus de dégradation de la paroi.

La reproduction des symptômes de la pourriture humide avec une préparation enzymatique acellulaire prouve l'implication des pectinases dans la pathogénèse.

Pour dépolymériser les pectines, les *Erwinias* synthétisent plusieurs enzymes.

On distingue trois réactions enzymatiques principales :

- la déestérification par la **pectine méthyl estérase** ou **PME**. Celle-ci enlève le groupement méthyl lié au carbone 6 de certains résidus galacturonates. (voir figure 14)
- l'hydrolyse des liaisons glycosidiques par la **polygalacturonase** ou **PG**. (voir figure 15)
- la  $\beta$ -élimination par la **pectate lyase** ou **PL**, générant des oligomères insaturés sur l'extrémité non réductrice par rupture des liens glycosidiques  $\alpha$ -1,4. (voir figure 16)

Généralement, les enzymes PG et PL peuvent attaquer leur substrat de deux manières :

- par une extrémité, libérant ainsi de petits oligomères. On parle dans ce cas d'une enzyme **EXO**.
- au hasard, libérant une série de petits polymères de tailles variables. L'enzyme possède alors une activité **ENDO**.

Une série d'expériences réalisées tend à prouver l'importance de l'implication des PL dans le cas de la pourriture molle :

a. L'enzyme purifiée peut macérer les tissus végétaux de manière similaire aux bactéries (la macération étant définie comme la séparation des cellules entre elles). Ce qui révèle d'autre part l'importance structurale des polymères pectiques. (Basham & Bateman, 1975)

b. Des mutants d'Ech, déficients dans la production de PL extracellulaires sont incapables de provoquer la macération tissulaire. (Chatterjee & Starr, 1977)

c. Des clones recombinants d'E.coli capables de synthétiser la PL d'Ech présentent la propriété de macérer les tissus. (Keen et al, 1984)

Les enzymes pectiques sont donc capables de provoquer la mort cellulaire. L'explication la plus simple de leur effet léthal est la suivante : une hydrolyse ou  $\beta$ -élimination des liens pectiques (Endopectic enzyme) provoquerait la séparation des cellules et la destruction des parois. La nécrose serait le résultat de l'incapacité des parois du végétal à résister à la pression de turgescence du protoplaste qui provoque la rupture du plasmalemmes. Cependant, des hypothèses proposant une interaction entre l'enzyme et le plasmalemmes ont été émises. (Vogt et Coulomb, 1984)

Un rôle prépondérant dans la pathologie de la pourriture humide n'a pu être démontré que pour les PL. Aujourd'hui, on sait que ces enzymes sont couramment impliquées dans divers types de maladies, la plupart des bactéries et des champignons pathogènes étant capables de les synthétiser.

Cependant, tester les contributions des PL à la pathogénèse est compliqué par plusieurs facteurs :

- 1 . Ils présentent des effets multiples sur les tissus végétaux puisque les polymères pectiques constituent :
  - . un support mécanique à la turgescence du protoplasme et à la cohésion du tissu.
  - . une barrière à la pénétration des parasites
  - . une source d'éliciteurs du système de défense de l'hôte.
- 2 . Ils ne sont qu'une composante de la pathologie.
- 3 . Ils sont produits par de nombreux organismes, tous n'étant pas pathogènes.

Ces différentes observations amènent à poser la question du véritable rôle des enzymes pectiques dans la pathologie.

## 7- LA RELATION *Solanum tuberosum* - Eca

### A/ Préliminaires

Depuis longtemps, des techniques sont mises au point afin de détecter et de quantifier des différences entre plusieurs cultivars du point de vue de la résistance aux agents de la pourriture molle, dans un intérêt évident de sélection.

Suite aux travaux réalisés au département de phytopathologie de Gembloux, nous disposons de deux variétés de pommes de terre, l'une étant plus sensible à Eca (var Charlotte), l'autre étant plus résistante (var Alpha).

L'origine de cette différence peut être multiple, la réponse d'une plante à l'invasion d'un pathogène étant complexe.

Nous allons, dans les paragraphes suivants, tenter d'en faire le tour.

## B/ La réponse de l'hôte à la présence d'Eca

L'interaction entre un pathogène pectolytique (Ecc) et son hôte potentiel (*Solanum tuberosum*) doit, pour s'établir, répondre à certains impératifs :

### B.1. Virulence du pathogène

Le pathogène devra avant tout posséder les gènes codants pour des enzymes pectolytiques actives ainsi que les systèmes de régulation nécessaires à leur expression caractéristique. De plus, ces enzymes devront être exportées jusqu'au sein du tissu hôte.

#### Remarque : La régulation des enzymes pectiques

Ecc est capable de synthétiser une série d'enzymes pectolytiques: endoPL et exoPL

endoPG et exoPG

PME

Les lyases présentent un pH optimal plus élevé que les enzymes hydrolytiques et requièrent la présence de cations bivalents.

Seules les PL semblent capables de macérer les tissus, aussi, la sécrétion et la régulation de celles-ci ont été très étudiées.

La synthèse de la PL présente deux caractéristiques principales : \* taux basal élevé

\* induction très rapide par des composés d'origine pectique

L'induction de la synthèse de la PL débute par une phase de digestion extracellulaire durant laquelle des oligogalacturonates sont libérés sous l'action de cette même enzyme synthétisée à un taux basal (Collmer & Bateman, 1981). Ces fragments pectiques, des dimères essentiellement, sont ensuite ingérés par la cellule et métabolisés en pyruvate et glycéraldéhyde 3 Pi en passant par 5 étapes enzymatiques dont certains intermédiaires sont capables d'induire la synthèse de PL. (Collmer & Bateman, 1982 ; Chatterjee et al, 1985) Cette synthèse est réprimée par le glucose (Moran & Starr, 1969) ainsi que par des oligogalacturonides à concentration élevée (self catabolite repression). (Collmer & Bateman, 1982)

## B.2. Mise en contact

L'entrée du pathogène nécessite également que quelques conditions soient remplies. En effet, les *Erwinias* sont incapables de traverser la cuticule du végétal. Elles devront donc profiter des blessures et des entrées naturelles que sont les stomates, les hydrotodes au niveau de la tige, et les lenticelles sur les tubercules. (Pérombelon, 1983)

Cependant, les tissus blessés (caractérisés par un apport important de substances organiques) constituent la porte d'entrée principale pour les *Erwinias* qui montrent un chémo-tactisme positif pour ceux-ci. (Hsu & Huang, 1987)

Rappelons qu'une humidité relative élevée est également une condition à l'établissement d'une infection.

### B.3. La relation avec le macergène

Lorsque la bactérie et le tissu de l'hôte potentiel sont en présence (les conditions reprises ci-dessus étant remplies), plusieurs situations dépendantes de l'hôte peuvent se présenter. En effet, si celui-ci expose un substrat protégé (1), sa macération sera rendue plus difficile. Dans le cas contraire, l'enzyme, alors active, pourra cliver les polymères pectiques structuraux des parois primaires et des lamelles mitoyennes (2).

. (1)- La structure de la paroi végétale peut constituer un premier facteur de résistance aux bactéries agents de la pourriture humide. Premièrement, la pectine, composé central impliqué dans la macération des tissus peut, par sa composition, être plus ou moins sensible à l'action enzymatique. Par son degré d'estérification (DE) par exemple, puisqu'on a constaté que des cultivars plus résistants sont caractérisés par un contenu plus élevé en pectine estérifiée (Weber, 1983). En accord avec cette observation, les mesures de l'activité de la PL en fonction du DE montrent que celle-ci chute alors que l'estérification augmente (Pagel & Heitefuss, 1990).

D'autre part, Lyon & Forest (1989) ont observé que des quantités plus faibles d'oligomères sont libérées à partir d'une pectine hautement méthylestérifiée (70 %). Ces résultats suggèrent donc que la méthylation serait capable de réduire l'activité de la PL. On soupçonne l'acétylation d'influencer la PL de façon semblable. (Weber, 1983)

Ensuite, des polymères complexes tels que la cutine, la subérine et la lignine qui sont également des composés de la paroi végétale, constituent autant de barrières à l'infection puisque les *Erwinias* sont incapables de les dégrader enzymatiquement.

Enfin, les composés phénoliques présents dans les parois des pommes de terre (Robertson et al, 1968; Kuc, 1973) pourraient contribuer de façon importante au mécanisme général de défense, spécialement au niveau des tubercules (Lovrekovitch et al, 1967) :

- \* en inhibant directement la croissance bactérienne. (Lyon & Mc Gill, 1988)
- \* en inhibant l'activité enzymatique (Farkas & Kiraly, 1962)

rem : les PG semblent être les seules inactivées, il n'existe actuellement que peu de données à ce sujet concernant les PL et les PME.

- \* parce qu'ils sont les précurseurs de la subérine, barrière physique à l'infection.

. (2)- La pectine intervient également activement dans les processus de défense par la libération d'oligosaccharides possédant une activité élicitrice de phytoalexines. Celles-ci, toxines non spécifiques produites par la plante, présentent une activité antibiotique vis-à-vis de nombreux organismes, procaryotes et eucaryotes, en provoquant la désorganisation des membranes cellulaires.

Les éliciteurs, composés divers dont entre autres, des carbohydrates dérivés des microorganismes ou des tissus végétaux eux-mêmes, sont capables d'induire les réactions de défense de la plante dans les cultures en suspension par exemple. La PL est capable de libérer des éliciteurs à partir de paroi de soja ou de pectine en solution (Davis et al, 1984; Forrest & Lyon, 1990). Parmi les oligosaccharides ainsi libérés, les déca- et undécagalacturonides possèdent la plus grande activité élicitrice (Davis et al, 1985 ; Forest et Lyon, 1990).

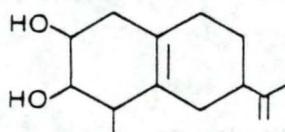


FIGURE 17 STRUCTURE DE LA RISHITINE

Ceci n'a pas été démontré sur les tissus de pdt. Toutefois, on sait que lors de l'infection par Eca, deux phytoalexines, la **rishitine** et la **phytotuberine** sont produites en condition aérobie (Lyon, 1972). Seule la rishitine (voir figure 17), accumulée à des taux élevés, possède une activité inhibitrice de la croissance d'Eca in vitro (Lyon & Baylis, 1975) et in vivo (Lyon et al, 1981).

Rem : la rishitine n'a pu être détectée qu'en quantités très faibles au niveau des tiges de pdt infectées (Lyon, non publié). Des mécanismes de résistance différents selon l'organe concerné semblent donc être mis en jeu chez les végétaux.

D'autre part, un oligosaccharide dérivé d'une pectine hautement méthylée peut constituer un facteur inducteur de protéinases: le **PIIF** (Protéinase Inhibitor-Inducing Factor) (Lee et al, 1986; Graham et al, 1985, 1986). Chez les pdt les inhibiteurs de protéinases ont été principalement caractérisés au niveau des tubercules.

Les Erwinias semblent produire une protéase, cependant son rôle durant la pathogenèse n'est pas connu. Si celui-ci est de fournir des acides aminés à la bactérie, les inhibiteurs de protéases pourraient empêcher la multiplication bactérienne.

#### Les autres défenses dirigées contre les enzymes pectiques :

On reconnaît l'existence d'un mécanisme oxygène-dépendant de résistance aux enzymes pectolytiques d'E. carotovora ( Maher, 1983). En effet, des conditions telles qu'elles diminuent la pression partielle en O<sub>2</sub> (ex : film d'eau autour du tubercule) ont pour résultat d'augmenter la sensibilité de la plante.

Ce phénomène est en partie explicable par le fait que les Erwinias sont des bactéries anaérobies facultatives dont la production de PL extracellulaire est augmentée quand la teneur en oxygène diminue. Cependant, l'augmentation de la sensibilité des tubercules de pomme de terre a été également observée en présence des enzymes (PL) purifiées.

Ces observations suggèrent donc qu'un mécanisme oxygéné-dépendant contribue à la résistance aux macergènes.

D'autre part, un contenu élevé en calcium est généralement associé à une résistance plus importante pour plusieurs pathologies (Bateman & Millar, 1966). Ceci a également été observé dans le cas de la pourriture humide de la pdt (Weber, 1983 ). L'explication proposée est simple, le calcium présent se complexe avec la pectine, ce qui rend celle-ci moins sensible à l'action des enzymes pectiques. Cependant, aucune expérience publiée à ce jour ne permet d'accréditer cette hypothèse. Le calcium est également un messenger secondaire qui intervient lors de l'élicitation des phytoalexines (Zook et al, 1987). De plus, il n'est pas sans influence sur les enzymes pectiques, puisque cofacteur de la pectate lyase. Il pourrait également contribuer à un changement local du pH en déplaçant les protons des acides uroniques, ce qui expliquerait pourquoi la PL est active au sein de la paroi végétale. Ainsi, le calcium influencerait de plusieurs manières la relation hôte-pathogène.

Un ensemble complexe de mécanismes intervient donc pour limiter une infection par les Erwinias, soit en affectant directement la croissance bactérienne, soit en influençant l'activité des enzymes lytiques. Ses composants et les interactions qui les lient sont encore très peu connus et méritent d'être investigués.

## 8- OBJECTIF ET DEMARCHE DU TRAVAIL

Face à la complexité des relations entre le végétal et le macergène, nous nous sommes plus particulièrement intéressés à l'étude des pectines. En effet, leur implication dans les processus de macération (séparation des cellules entre elles) est établie puisque les enzymes pectolytiques sont capables de macérer les tissus (Mount et al, 1970).

De plus, les pectines semblent pouvoir influencer la relation entre le macergène et son hôte par l'estérification de leurs groupements carboxyliques. En effet, il a été démontré que :

- \* l'activité des enzymes pectolytiques diminue quand le degré d'estérification (DE) de leur substrat augmente. (Pagel & Heitefuss, 1990);
- \* la méthylation réduit la capacité de la pectate lyase (PL) (Eca) à libérer des fragments pectiques présentant une activité élicitrice élevée (Forrest & Lyon, 1990);
- \* les pectines extraites de tissus plus résistants présentent un DE plus élevé. (Weber, 1983)

Cependant, les méthodes d'extraction sont partielles et dénaturantes, c'est pourquoi il est nécessaire de confirmer cette relation par d'autres expériences.

Nous avons considéré deux cultivars de *Solanum tuberosum*, Alpha et Charlotte, le second se distinguant par une plus grande sensibilité à la macération par Eca (caractéristique établie au laboratoire de phytopathologie de Gembloux). Ces cultivars devaient permettre de vérifier l'existence d'une corrélation entre le taux d'estérification des pectines et la sensibilité du végétal au macergène.

Notre travail a été réalisé en quatre étapes successives, la première s'attachant à confirmer la plausibilité de notre hypothèse en vérifiant la diminution de l'activité de la PL secrétée par Eca (capable de macérer les tissus in vitro) lorsque le taux d'estérification de son substrat augmente.

Ensuite, nous avons étudié l'action de cette enzyme pectolytique (la PL) sur les tissus afin de s'assurer que la différence de sensibilité entre les deux cultivars vis-à-vis du pathogène existe également vis-à-vis des enzymes. La preuve de l'influence de l'activité des enzymes pectolytiques sur les phénomènes de résistance étant ainsi démontrée, nous pouvions passer à l'étape suivante : étudier les pectines et leur DE dans leur état natif en utilisant la technique du marquage immunologique sur tissus fixés, méthode très spécifique puisque basée sur les anticorps monoclonaux. Enfin, nous avons observé les tissus infectés en utilisant cette même technique.

## II. PARTIE EXPERIMENTALE

### Chapitre 1 : Influence du DE sur l'activité de la PL

Avant de débiter notre travail, il était important de vérifier la plausibilité de notre hypothèse de départ (à savoir qu'un DE élevé de la pectine participe à la résistance du végétal aux macergènes).

Nous avons donc mesuré l'activité enzymatique de la PL dont l'importance dans la macération a été prouvée (voir introduction page 10) en fonction du DE, celui-ci étant défini comme la proportion d'acides galacturoniques méthylestérifiés pour 100 acides galacturoniques totaux.

L'enzyme extracellulaire, a été isolée à partir du milieu de culture de la bactérie macergène Eca.

#### 1.A Matériel et méthode

##### 1.A.1, Milieu de croissance et de conservation du pathogène :

La souche Eca (isolat n°60424) est conservée sur milieu solide de composition suivante :

MgSO<sub>4</sub> 0.2 g/L

KHPO<sub>4</sub> 1,5 g/L

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 7.15 g/L

(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 3.0 g/L

pH : 7 - 7.4

et 1,5 % Agar (Sigma n° A-7002)

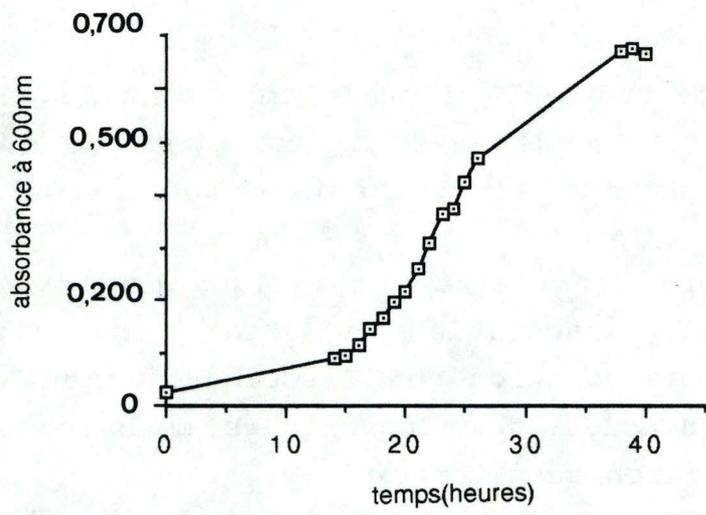


FIGURE 17 B courbe de croissance de ERWINIA CAROTOVORA

Un milieu de composition identique (sans agar) est utilisé pour assurer sa croissance. Celui-ci estensemencé au départ du milieu de conservation et placé à 25°C.

La croissance bactérienne peut être suivie via l'absorbance du milieu de culture à 600 nm.

1.A.2. Production de la PL : Après 40 H environ, la culture étant alors au début de la phase stationnaire (voir figure 17B), le milieu est centrifugé pendant 20 min à 20.000 g (Du Pont Instruments, Sorvall RC-5B). Le surnageant qui contient les enzymes extracellulaires, est filtré sur microfibrilles de verre 1.6  $\mu$ , puis dialysé à 4°C contre une solution Tris 50 mM, CaCl<sub>2</sub> 1 mM à pH 8,5. La solution est ensuite stérilisée par filtration sur sartorius 0.2  $\mu$  et conservée à -20°C.

Des expériences réalisées au laboratoire (J. Messiaen) ont montré que la solution obtenue contient essentiellement de la PL, la PG n'étant présente qu'en quantité très faible, nous l'avons donc utilisée telle qu'elle.

1.A.3. Mesure de l'activité de la PL : deux substrats ont été utilisés

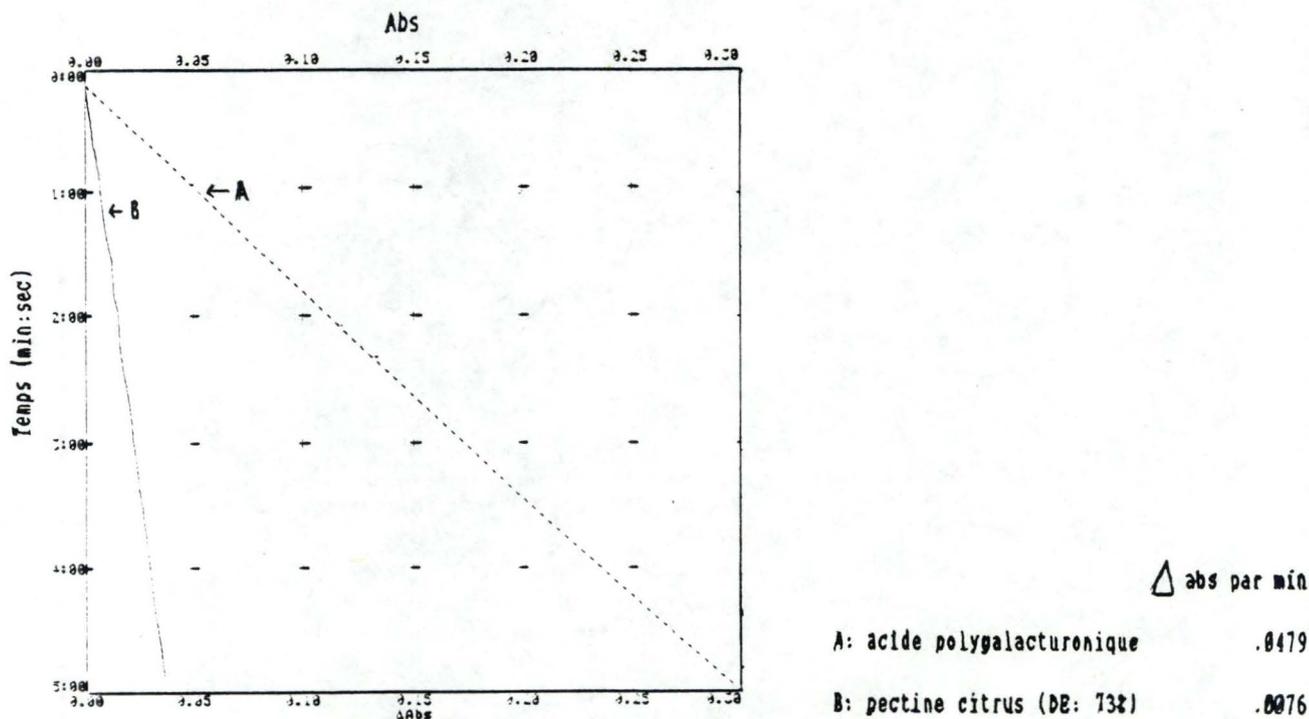
- l'acide polygalacturonique, non estérifié (Sigma, n° P-3889)
- la pectine de citrus, estérifiée à 73 % (Sigma, n° P-9135)

Ceux-ci sont dilués dans une solution Tris 50 mM, CaCl<sub>2</sub> 1 mM, pour obtenir une concentration en pectine de 1 mgr par litre. L'activité enzymatique de la PL est déterminée via la mesure de l'absorbance à 235 nm des produits insaturés de dégradation (Jarvis et al, 1984). Une augmentation de 0.26 unité d'absorbance équivaut à la libération de 0.1  $\mu$ mole de groupements aldéhydiques (cuvette quartz 1 cm).

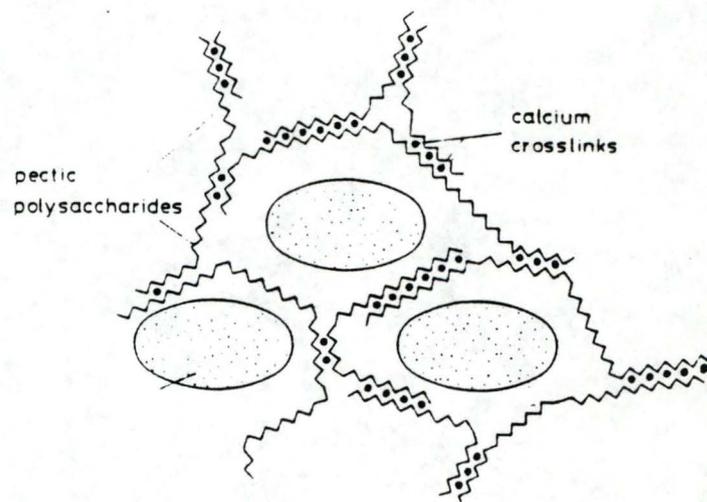
D'autre part, une unité d'activité de la PL est définie comme la quantité d'enzyme requise pour libérer 1.0  $\mu$ mole par minute de produit insaturé à 25°C. Les mesures d'activité enzymatique ont été réalisées sur spectrophotomètre U-V/Visible PU 8700 PHILIPS après mise en présence de 0,5 ml de solution enzymatique et de 3 ml de tampon contenant le substrat (1 mgr par ml) dans la cuvette en quartz.

Le zéro est réalisé avec les deux solutions en présence.

### 1.B Résultats



**figure 18** : Mesure de l'activité enzymatique selon la nature du substrat, acide polygalacturonique non estérifié (A) ou pectine estérifiée à 73 % (B) via la variation de l'absorbance à 235 nm ( $\Delta$  Abs) des uronides insaturés libérés par la pectate lyase au cours du temps (min:sec).



**FIGURE 19** Diagram showing the importance of calcium cross-links between pectic polysaccharides and their contribution to the cell-wall architecture.

La libération par la PL de produits de dégradation suivie par la mesure de l'absorbance à 235 nm, apparaît beaucoup plus importante sur le substrat non estérifié.

Si l'on sait qu'une augmentation de 0.26 unité d'absorbance correspond à la libération de 0,1  $\mu$ mole d'uronides insaturés, alors on peut dire que la PL libère par minute 0,0126  $\mu$ mole d'uronides insaturés sur un substrat non estérifié et seulement 0,0020  $\mu$ mole sur un substrat plus estérifié.

L'activité enzymatique de la PL secrétée par le macergène Eca est donc environ 6 X plus élevée sur un substrat non estérifié par comparaison à un substrat estérifié à 73 %

#### 1.C Résumé

Nous pouvons conclure que l'activité de la PL est effectivement influencée par le DE de son substrat. La méthylation des groupements carboxyliques des acides uroniques réduit donc l'action pectolytique de l'enzyme principalement impliquée dans les processus de macération.

Le DE pourrait donc influencer la résistance d'un végétal à la macération par un pathogène comme Erwinia en diminuant l'effet pectolytique des enzymes (la pectine non dégradée étant capable de maintenir la cohésion des parois et donc des tissus, voir FIGURE 19 )

## Chapitre 2 :

### Induction enzymatique de la macération et de la mort cellulaire

La pectate lyase (PL) en dégradant les polymères pectiques est responsable de la déstabilisation des parois primaires et des lamelles mitoyennes, elle prive donc la cellule végétale de son support à la turgescence et la rend très sensible au stress osmotique (Basham & Bateman, 1975; Bateman 1976; Stephens & Wood, 1975).

Nous avons étudié l'action de la PL par la mesure de l'absorbance (au cours du temps) des produits insaturés de dégradation, ainsi que par la mesure de la conductivité (au cours du temps) qui permet de suivre la libération des électrolytes dans le milieu extérieur suite à la rupture de la membrane plasmique du protoplaste (désigne une cellule végétale sans paroi).

Ces mesures ont été réalisées sur deux cultivars de *Solanum tuberosum*, Alpha et Charlotte, le second étant caractérisé par une plus grande sensibilité à l'infection par un macergène au niveau des tiges (caractéristique établie par le laboratoire de phytopathologie de Gembloux).

Pour chaque expérience, deux contrôles ont été réalisés. Le premier (CTRL100) consiste à mettre en contact les tissus et l'enzyme dénaturée (30 min à 100°C), il permettra de vérifier que ce qui est observé est bien la conséquence de l'activité de la PL. Le second (CTRL-20) consiste à mettre en contact l'enzyme active et les tissus tués par congélation à -20°C, il permettra de vérifier que ce qui est observé est ou non la conséquence d'une réaction active de la cellule en réponse à la présence de la PL.

Ces conditions expérimentales doivent nous permettre de vérifier que les différences de sensibilité entre les deux cultivars sont liées à la pectine.

## 2.A Matériel et Méthode

2.A.1 Matériel végétal : Cultivars Alpha et Charlotte, tubercules et tiges, fournis par l'unité de phytopathologie de Gembloux (professeur J.Semal). Les tubercules ont été conservés à 4°C à l'abri de la lumière. Les tiges sont cultivées in vitro sous lumière (1700 lux) et température (25°C) constantes.

Le milieu de culture est le suivant:

Sels de Murashige et Skoog	4.7 g/L
Sucrose	10.0 g/L
Agar (Sigma n° A-7002)	8.0 g/L
hydrolysate de caséine	0.1 g/L
pH 5,7	

2.A.2 Production de la PL : protocole voir page

### 2.A.3 Préparation du matériel végétal

- a- **les tiges** : les microplantules d'âge identique sont coupées à leur base et effeuillées afin de ne conserver que les tiges. Celles-ci sont coupées finement dans le sens de la largeur et rincées dans H<sub>2</sub>O stérile. On pèse 0.2 g après égouttage que l'on dépose dans 5 ml de solution enzymatique active d'une part et dénaturée d'autre part, la solution inactivée par traitement à la chaleur (30 min à 100 °C) étant utilisée comme contrôle (CTRL100).  
Des tiges préalablement préparées et placées à -20°C sont dégelées et mises en contact avec la solution enzymatique active à 25°C. Les tissus ainsi "tués" sont utilisés comme contrôle (CTRL-20).

b- **les tubercules** : sont épluchés puis stérilisés par passage dans différents bains successifs : 15 sec dans l'éthanol absolu d'abord, 15 min dans une solution d'hypochlorite de sodium ensuite, puis rincés dans H<sub>2</sub>O stérile (3 x 5 min).

Les tubercules sont alors coupés à l'emporte-pièce (diamètre 0.6 cm), puis en rondelles d'environ 2 mm d'épaisseur.

rem : afin d'assurer l'homogénéité de l'échantillonnage, seule la partie centrale des tubercules a été utilisée.

Les rondelles sont rincées 3 x 5 min dans H<sub>2</sub>O puis placées dans 5 ml de solution enzymatique active ou inactive (CTRL100).

Un second contrôle avec le tissu préalablement congelé est également réalisé (CTRL-20).

2.A.4 **Mesure de l'activité enzymatique** : l'activité enzymatique de la PL des solutions non dénaturée et dénaturée par traitement à la chaleur 30 min à 100°C est préalablement mesurée en :

tampon Tris 50 mM  
+ CaCl<sub>2</sub> 1 mM  
pectine (Sigma n° P-3889): 1 mgr/ml  
pH : 8,5

Les mesures sont réalisées via l'absorbance à 235 nm des produits insaturés de dégradation sur spectrophotomètre U-V/Visible PU 8700 PHILIPS en cuvette quartz (1 cm) à 25 °C.

2.A.5 **Mesure des variations d'absorbance et de conductivité** :

Nous avons suivi l'évolution de la conductivité (conductimètre TACUSSEL type CD810) ainsi que l'absorbance à 235 nm (spectrophotomètre U/V Visible PU 8700, PHILIPS) au cours du temps sur tiges et tubercules des deux cultivars Alpha et Charlotte, préparés comme indiqué ci-dessus.

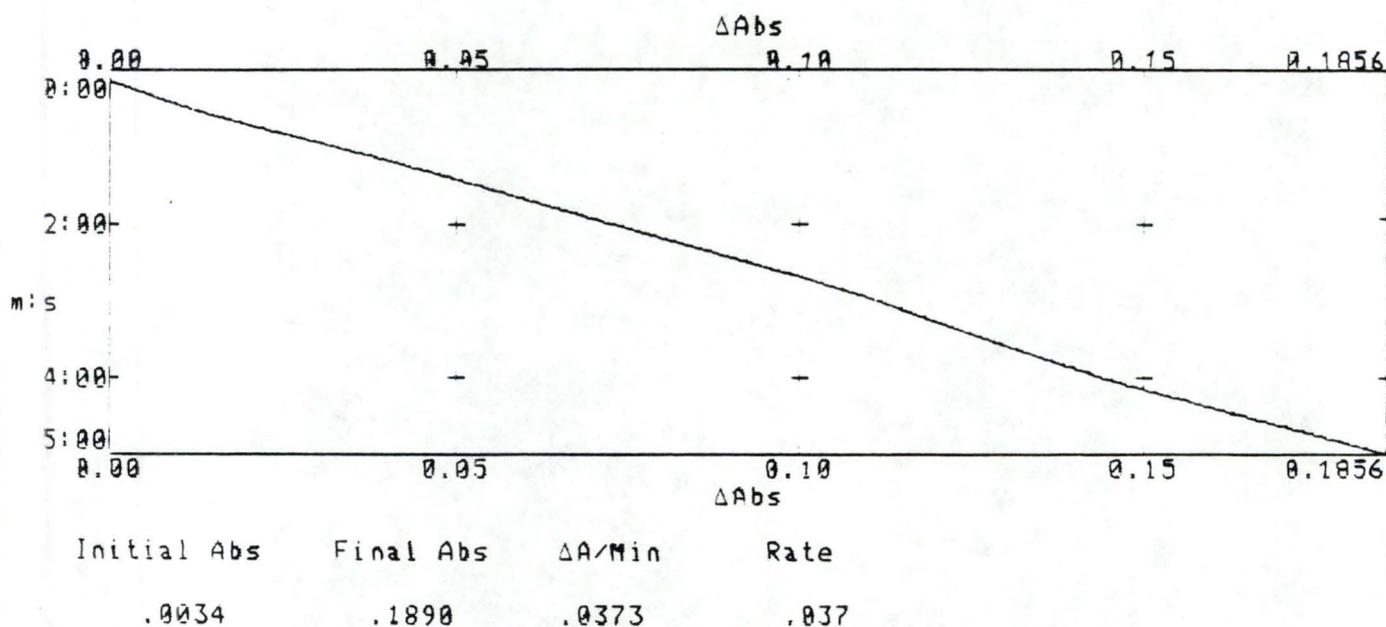
Les expériences ont été réalisées dans des conditions expérimentales identiques : solutions enzymatiques, température (25°C) et agitation.

D'autre part, les mesures d'absorbance et de conductivité sont réalisées sur les mêmes échantillons simultanément.

## 2.B RESULTATS

### 2.B.1 Activités enzymatiques des solutions

#### 1.1 Enzyme active



**Figure 20** : mesure de l'absorbance à 235 nm des uronides insaturés libérés par la PL au cours du temps (min:sec). Conditions expérimentales : tampon Tris 50 mM; CaCl<sub>2</sub> 1 mM; substrat : acide polygalacturonique; pH : 8,5; T° : 25°C. L'activité de l'enzyme est estimée par la variation de l'absorbance par minute des produits insaturés de dégradation.

1.2 Enzyme dénaturée (30 min à 100°C)

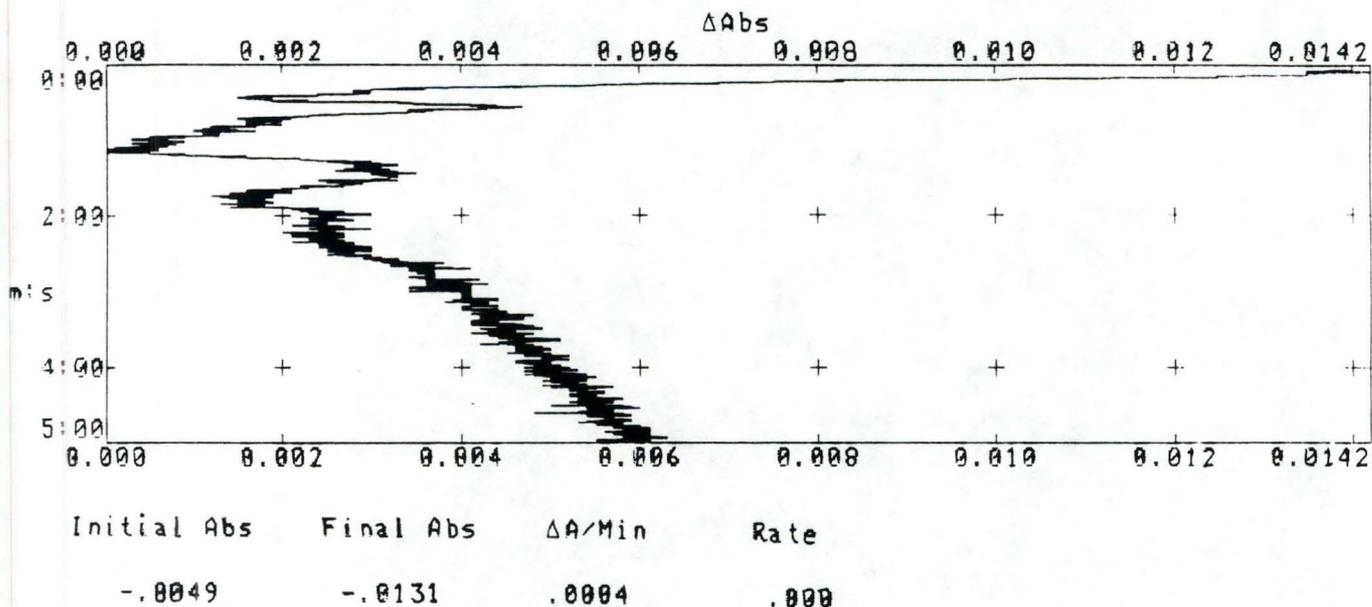


Figure 21 : mesure de l'absorbance à 235 nm des uronides insaturés libérés par la PL au cours du temps (min:sec). Conditions expérimentales : tampon Tris 50 mM; CaCl<sub>2</sub> 1 mM; substrat: acide polygalacturonique; pH: 8,5; T°: 25°C. L'activité de l'enzyme est estimée par la variation de l'absorbance par minute des produits insaturés de dégradation.

L'enzyme active libère 0,0144 μmole d'uronides insaturés par minute. L'enzyme après 30 min à 100°C est complètement inactivée.

## 2.B.2 Mesures d'absorbance et de conductivité

### a- Tiges

#### a-1 Evolution de l'absorbance

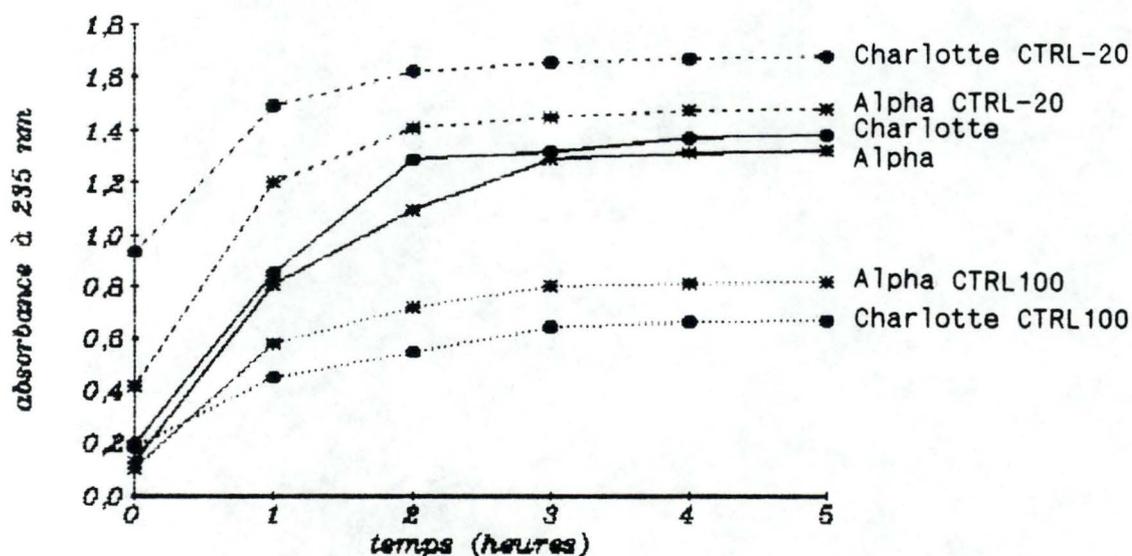
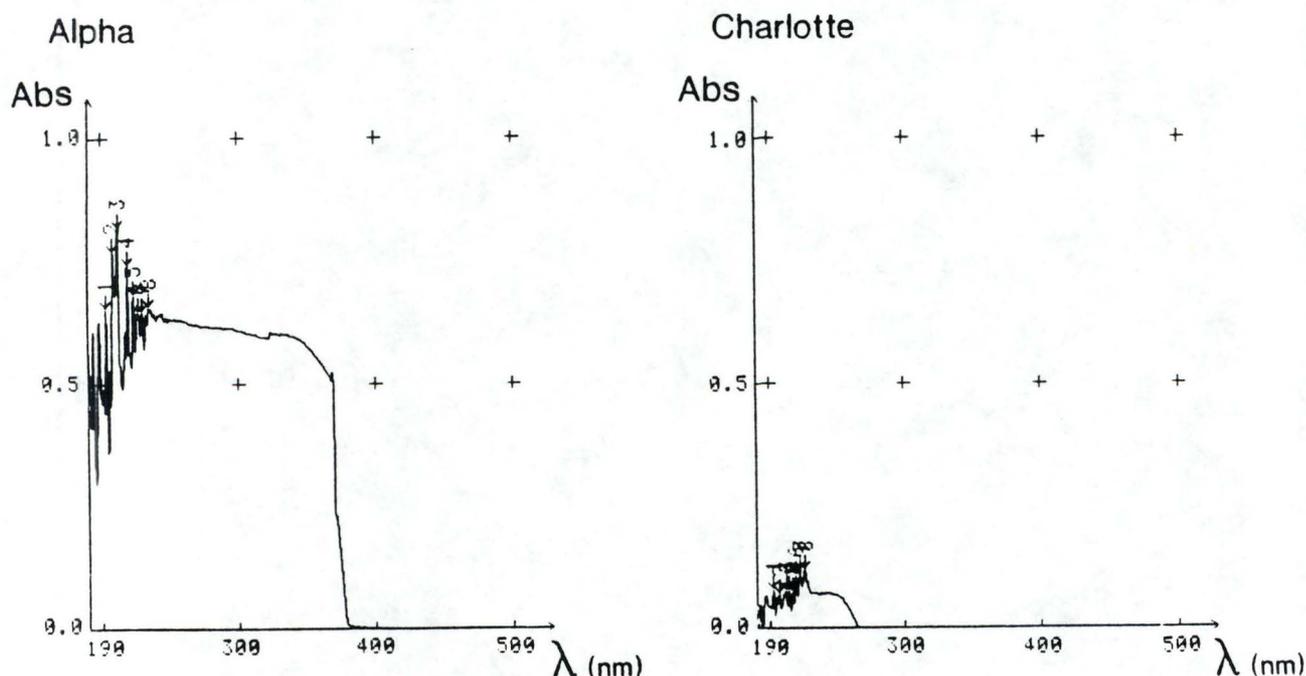


Figure 22 : évolution de l'absorbance à 235 nm au cours du temps (heures) de la solution enzymatique au contact des tiges des cultivars Alpha et Charlotte, en réponse à la présence de l'enzyme (la PL). L'enzyme inactivée par la chaleur (CTRL100) et les tissus tués par congélation (CTRL-20) constituent les deux contrôles de cette expérience. Chaque donnée sur le graphique correspond à la moyenne des valeurs de trois échantillons.

Les tissus en contact avec le surnageant contenant l'enzyme active libèrent des composés absorbant à 235 nm pendant 2 à 3 h environ, l'évolution de l'absorbance étant très semblable pour les deux cultivars. Cependant, des divergences apparaissent au niveau des contrôles.

\* CTRL-20 (tissus tués par congélation en présence de l'enzyme active) : ceux-ci montrent que les tissus du cultivar Alpha attaqués par la PL libèrent moins d'uronides insaturés par comparaison à Charlotte. Cette différence indique donc que la pectine du cultivar moins sensible est moins dégradée par la PL, et cela indépendamment de toute réponse physiologique de la plante.

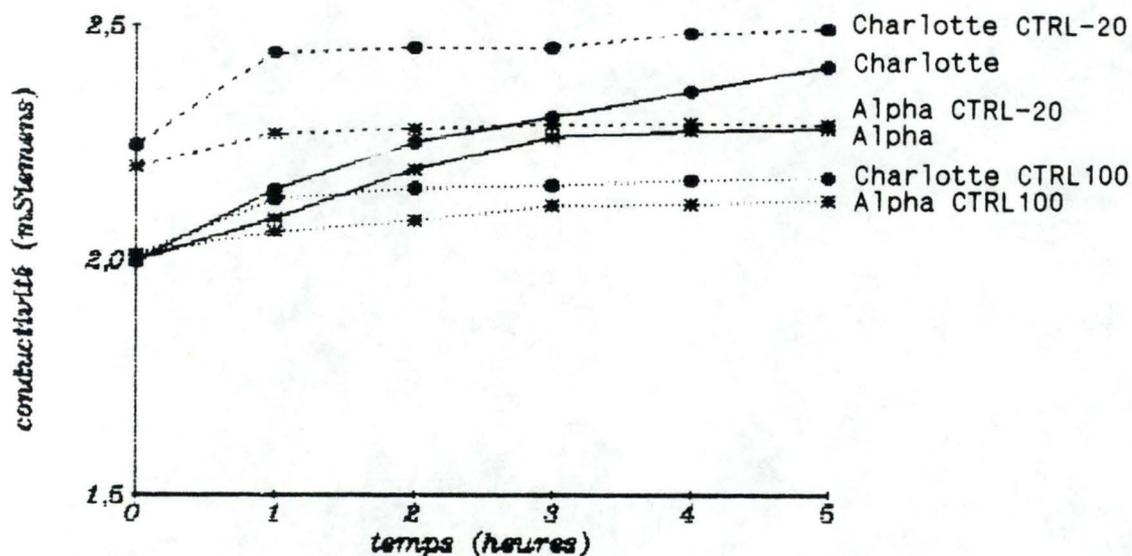
\* CTRL100 (tissus vivants en présence de l'enzyme dénaturée) : l'augmentation de l'absorbance à 235 nm au cours du temps qui apparaît de façon plus marquée avec le cultivar Alpha alors que l'enzyme est inactive, pourrait indiquer que ces tissus synthétisent et libèrent des composés de type phénolique. Cette hypothèse peut être partiellement vérifiée en mesurant l'absorbance aux longueurs d'onde de 190 à 400 nm des surnageants de nos CTRL100.



**Figure 23** : mesure de l'absorbance aux longueurs d'onde de 190 à 400 nm des solutions contenant l'enzyme inactivée (30 min à 100°C) en présence des tiges des cultivars Alpha et Charlotte (après 24 h).

Les tiges du cultivar Alpha possèdent donc la propriété de libérer une série de composés, susceptibles d'intervenir dans les réactions de défense du végétal.

#### a-2 Evolution de la conductivité



**Figure 24** : évolution de la conductivité au cours du temps (heures) de la solution enzymatique au contact des tiges des cultivars Alpha et Charlotte, en réponse à la présence de l'enzyme (la PL). L'enzyme inactivée par la chaleur (CTRL100) et les tissus tués par congélation (CTRL-20) constituent les deux contrôles de cette expérience. Chaque donnée sur le graphique correspond à la moyenne des valeurs de trois échantillons.

Nous observons une libération d'électrolytes plus importante et se prolongeant plus longtemps avec les tiges des cultivars Charlotte. Ceci peut constituer le signe d'une plus grande sensibilité à la lyse membranaire, conséquence de la présence de la PL active.

D'autre part, les contrôles montrent que la diffusion complète des électrolytes au travers des tissus prend environ 1 à 2 heures et que la quantité d'électrolytes libérés par Charlotte est plus élevée que dans le cas d'Alpha.

## b Tubercules

### b-1 Evolution de l'absorbance

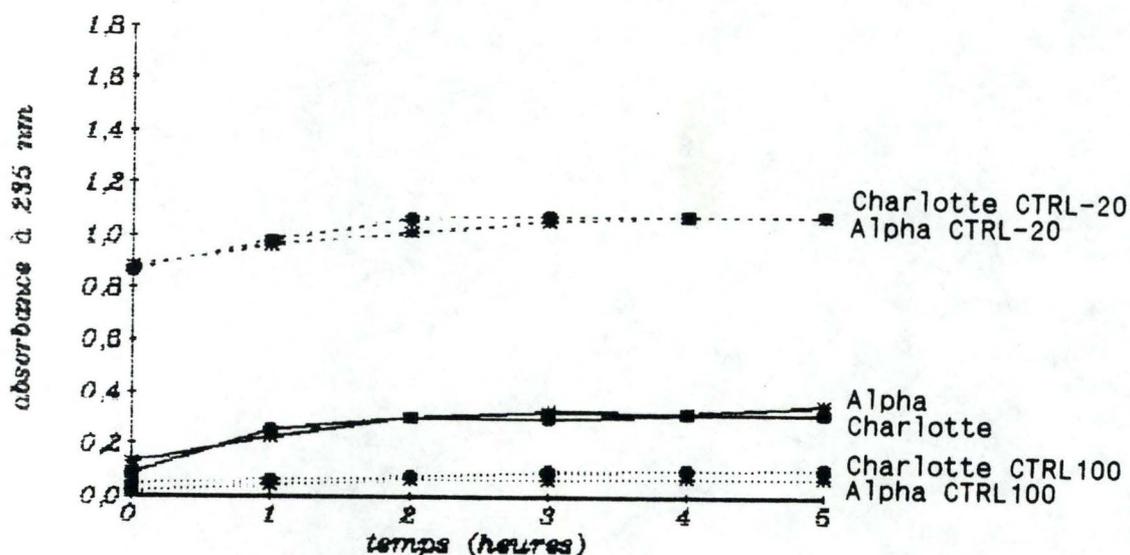


Figure 25: évolution de l'absorbance à 235 nm au cours du temps (heures) de la solution enzymatique au contact des tubercules des cultivars Alpha et Charlotte, en réponse à la présence de l'enzyme (la PL). L'enzyme inactivée par la chaleur (CTRL100) et les tissus tués par congélation (CTRL-20) constituent les deux contrôles de cette expérience. Chaque donnée sur le graphique correspond à la moyenne des valeurs de trois échantillons.

Les tubercules des deux cultivars placés dans des conditions identiques présentent le même comportement en présence de l'enzyme active ou dénaturée. Ceci montre que l'attaque enzymatique ainsi que la réponse à celle-ci est identique chez Alpha et Charlotte.

### b-2 Evolution de la conductivité

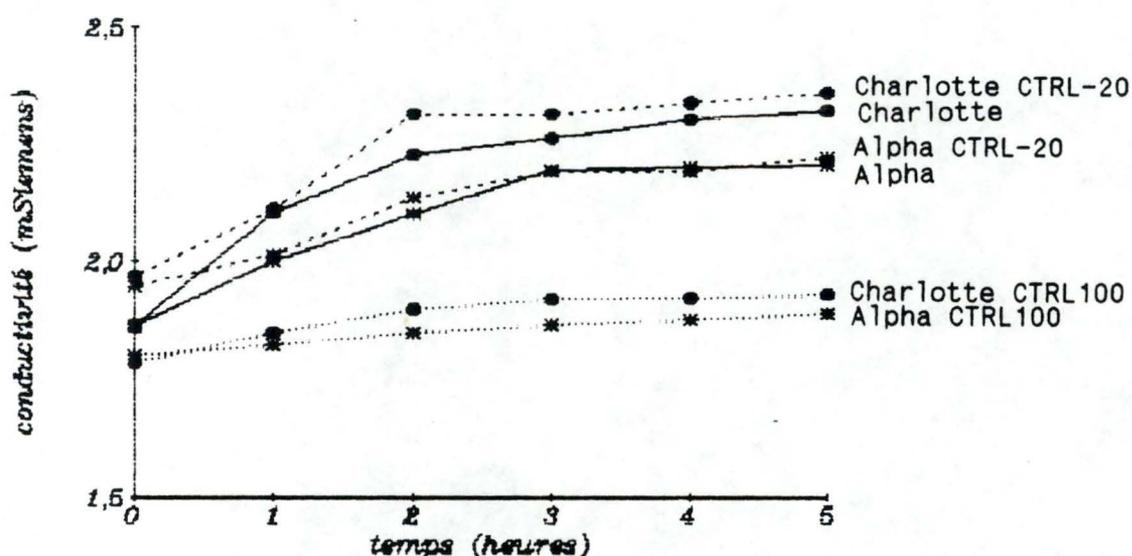


Figure 26 : évolution de la conductivité au cours du temps (heures) de la solution enzymatique au contact des tubercules des cultivars Alpha et Charlotte, en réponse à la présence de l'enzyme (la PL). L'enzyme inactivée par la chaleur (CTRL100) et les tissus tués par congélation (CTRL-20) constituent les deux contrôles de cette expérience. Chaque donnée sur le graphique correspond à la moyenne des valeurs de trois échantillons.

Les tubercules de la variété Charlotte apparaissent plus sensibles à la lyse cellulaire, elle-même conséquence de l'action pectolytique de la PL.

## 2.C Résumé

L'analyse de l'évolution de l'absorbance et de la conductivité nous permet de tirer plusieurs conclusions :

Elle fait d'abord apparaître que le comportement des tiges et des tubercules est différent bien que les échantillons soient placés dans des conditions identiques. Nous les considéreront donc séparément.

\* Au niveau des tiges : par comparaison avec les tissus du cultivar Charlotte, Alpha est caractérisé par une pectine qui semble moins sensible à la dégradation enzymatique par la PL. De plus, Alpha synthétise et libère des composés (dont le spectre d'absorption est compris entre 190 et 400 nm) indépendamment de l'activité de la PL. Ces composés dont nous ne connaissons pas la nature sont susceptibles d'intervenir dans les mécanismes de défense mis en place par la plante. Leur synthèse pourrait être induite soit en réponse aux blessures infligées aux tissus lors de leur préparation, soit par des molécules présentes dans la solution enzymatique (qui n'est autre que le surnageant de culture d'Eca dialysé). L'implication d'oligogalacturonides peut être suggérée, les propriétés élicitrices de ceux-ci ayant été démontrées sur hypocotyle de soja. (Forrest & Bateman, 1990)

D'autre part, les tissus du cultivar Charlotte semblent libérer une quantité plus grande d'électrolytes. Cette différence ne peut s'expliquer par un contenu plus important en sels (comme l'indique le CTRL100), elle constitue donc le signe d'une plus grande fragilité à la lyse membranaire. Puisque la lyse est la conséquence de la dégradation des parois, ces observations indiquent elles aussi que les parois du cultivar sensible sont plus dégradées par la PL.

\* Au niveau des tubercules : D'un point de vue général, ces tissus contiennent moins de cytoplasme et de paroi que les tiges (présence d'une énorme vacuole), l'augmentation de l'absorbance ou de la conductivité est donc plus faible.

Nous n'avons pas pu mettre en évidence une différence entre les deux cultivars quant à la dégradation des pectines. Cependant, la variété Charlotte se distingue comme au niveau des tiges, par une libération d'électrolytes plus importante.

Ces différentes observations montrent que la variété plus résistante (Alpha) est aussi la moins sensible à l'attaque de la PL, il reste à démontrer que cette différence peut être corrélée à un DE plus important.

### Chapitre 3 : évaluation du DE par marquage immunologique

Nous allons étudier dans ce chapitre le degré d'estérification des pectines des deux cultivars, Alpha et Charlotte, tubercules et tiges, par un marquage en microscopie électronique. Cette technique présente plusieurs avantages : outre sa spécificité et sa précision, elle permet l'étude des pectines dans leur état natif au sein des tissus fixés. Cependant, elle est aussi très longue car elle nécessite la mise au point de la méthode de fixation assurant une préservation maximale des structures. Celui-ci défini, la mise au point du protocole de marquage est également nécessaire.

Nous disposons d'un anticorps monoclonal dirigé contre un acide polygalacturonique, le 2F4 (Liners et al, 1990). Spécifique des polymères pectiques associés en "egg box" (voir INTRODUCTION page 7), son utilisation permet non seulement d'observer directement in situ la répartition des séquences homopolygalacturoniques dans la paroi, mais également indirectement d'évaluer son degré d'estérification (DE). En effet, seules les pectines faiblement estérifiées (DE < 30%) peuvent adopter la conformation dite en egg box. Or, il est possible par un traitement au NaOH, de déestérifier les pectines sur les coupes ultrafines préparées pour la microscopie électronique. Après un tel traitement, toutes les séquences pectiques pourront, en présence de calcium, adopter la conformation spécifiquement reconnue par le 2F4.

La comparaison des deux marquages, avant et après déestérification, permettant donc d'apprécier le DE des pectines au sein de la paroi.

### Etape n°1 : Mise au point du protocole de fixation

La première étape, préliminaire de notre travail, a été de définir et mettre au point le protocole de fixation des tissus que nous allons étudier: les tubercules et les tiges.

#### 3.1.A Matériel et méthode

3.1.A.1 Matériel végétal : Cultivar Charlotte, tubercules et tiges

3.1.A.2 Préparation des échantillons pour la microscopie : elle comprend la fixation, la déshydratation et l'enrobage. Nous considérerons ces étapes une à une.

\* **fixation** : les structures fines des cellules qui sont examinées par microscope électronique doivent préalablement être stabilisées par une fixation. Les fixateurs utilisés sont peu nombreux, les trois plus importants étant la glutaraldéhyde ( $\text{CHO}(\text{CH}_2)_3\text{CHO}$ ), le tétroxyde d'osmium ( $\text{OsO}_4$ ) et le permanganate de potassium ( $\text{KMnO}_4$ ).

Sur un matériel végétal, les meilleurs résultats sont obtenus par une double fixation séquentielle : glutaraldéhyde/tétroxyde d'osmium. Nous disposons de deux protocoles de fixation de tubercules de pdt, différant principalement quant à la nature du tampon utilisé. Nous les avons donc testés sur les tubercules et sur les tiges afin de retenir le plus efficace.

Molarité du tampon : 50 mM pour les tubercules (Lahert &

Kavanhagt, 1984; Van Denburgh et al, 1985). Pour les tiges,

suite aux travaux réalisés précédemment au laboratoire

(F.Liners), des tampons de 10 et 25 mM ont été testés.

Les protocoles sont comparés page suivante.

	<u>Lahert &amp; Kavanagh, 1984</u>	<u>Van Denburgh et al, 1985</u>
<u>Fixation</u> :	glutaraldéhyde 3 % tampon phosphate pH : 6,8 15 heures à 4°C	glutaraldéhyde 3 % cacodylate de Na pH : 7 2 heures à 20°C
<u>Rinçages</u> :	6 X 5 min dans le tampon	idem
Rem :	Ces rinçages sont nécessaires afin d'éliminer toute trace de glutaraldéhyde avant la postfixation au tétroxyde d'osmium, car les deux produits réagissent en formant un précipité.	
<u>Post fixation</u> :	OsO4 1 % dilué dans le tampon; 2 heures à 20°C	OsO4 1 % dilué dans le tampon; 1 heure à 20°C
<u>Rinçages</u> :	3 X 5 min dans le tampon 3 X 5 min dans H2O	idem idem
Rem :	les échantillons doivent être parfaitement rincés après la fixation car toute trace d'acide osmique peut précipiter lors de la déshydratation à l'éthanol.	

\* **Déshydratation** : cette étape constitue un préliminaire à l'infiltration de l'échantillon par la résine. Elle est assurée par un passage dans un gradient croissant en éthanol. Les cellules végétales fortement vacuolisées sont très sensibles à ce traitement.

\* **Enrobage** : il existe plusieurs milieux d'enrobage. Nous avons utilisé la résine EPON qui assure une bonne préservation des détails structuraux et qui constitue un bon support à l'observation.

protocole :

- Infiltration de l'oxyde de propylène pur (solvant de l'épon), 5X5 min.
- Infiltration de la résine : solution oxyde de propylène-épon dans un rapport V/V croissant :  
1/1 1 heure à 25°C  
1/2 1 heure à 25°C  
puis dans l'épon pur 2 H à 37°C.

Pour la polymérisation de la résine, l'échantillon est placé en capsule et enrobé dans la résine, puis mis 24 H à 37°C, 24 H à 45°C et enfin 24 H à 60°C.

Remarque : La coupe dans les tissus végétaux est caractérisée par quelques problèmes spécifiques. En effet, paroi, cytoplasme et vacuole présentent une résistance différente à la coupe. De plus, des inclusions telles que les grains d'amidon sont extrêmement résistantes.

### 3.1.B Résultats

3.1.B.1 Tubercules : La fixation par les deux tampons donne des résultats très semblables.

3.1.B.2 Tiges : Nous avons obtenu une meilleure conservation des structures en cacodylate de sodium qu'en tampon phosphate. Nous avons été confrontés à un important problème de plasmolyse à 25 mM comme à 10 mM. Cependant, descendre à des concentrations inférieures aurait entraîné la perte du pouvoir tampon. Nous avons alors cherché à réduire la pression partielle en H<sub>2</sub>O de l'atmosphère des pots stériles contenant les microplantules. Dans ce but, ceux-ci ont été ouverts sous hotte pendant des temps croissants (30 min, 1 h, 2 h et 4 h) avant de fixer les tissus. Les problèmes de plasmolyse n'ont pas pu être éliminés de cette manière.

Finalement, nous avons décidé de fixer les tiges dans le tampon cacodylate 10 mM sans réduire préalablement la pression partielle en H<sub>2</sub>O.

### 3.1.C Résumé

La méthode de fixation choisie suit le protocole de Van Denburgh et al, en tampon cacodylate de Na<sup>+</sup> 50 mM pour les tubercules et 10 mM pour les tiges

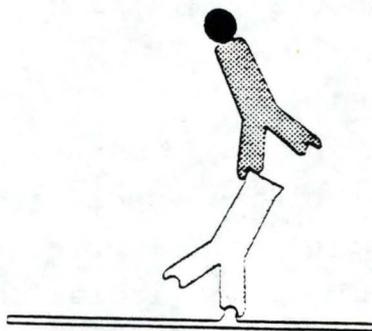


FIGURE 28 : Système indirect

Dans ce système, après une première étape d'incubation avec l'anticorps primaire, une deuxième étape d'incubation utilise un anticorps secondaire qui détecte l'anticorps primaire. Les deux anticorps sont produits dans des espèces différentes. Ainsi, l'anticorps primaire est p.ex. un anticorps de lapin anti-insuline de porc. Le second anticorps serait alors un anticorps anti-immunoglobulines de lapin produit p.ex. dans la chèvre. Cet anticorps *secondaire* porte le marqueur qui permet de visualiser le complexe des deux anticorps et de l'antigène

## Etape n° 2 : Les marquages immunologiques

Le protocole de marquage, précédemment mis au point au laboratoire (Liners et al 1990), est basé sur le principe du marquage indirect. (voir figure 28)

Nous l'avons testé initialement en microscopie optique sur les tissus fixés de *Solanum tuberosum* tubercule et tige.

(voir annexe 1 page 73)

### 3.2.A Matériel et méthode

3.2.A.1 Matériel végétal : Alpha et charlotte, tubercule et tige.

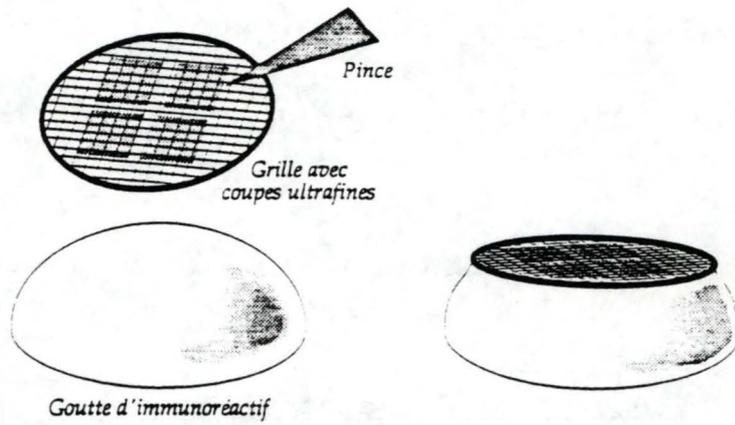
#### 3.2.A.2 Préparation des échantillons pour la microscopie :

**Fixation** selon la méthode de Van Denburgh et al, en tampon cacodylate de Na<sup>+</sup> \* 50 mM pour les tubercules  
\* 10 mM pour les tiges

**Déshydratation** : en gradient croissant en éthanol

**Enrobage** : L'épon, résine hydrophobe assurant une très bonne préservation ultrastructurale n'expose pas les sites antigéniques pour permettre une bonne reconnaissance immunologique. Aussi, avons-nous recouru à l'utilisation du LR White qui, hydrophile, permet le contact des solutions aqueuses avec les sites antigéniques enrobés par celui-ci. Cependant, les structures obtenues avec celle-ci sont de moindre qualité et la réalisation des coupes ultrafines est beaucoup plus délicate.

**Protocole d'enrobage** : l'échantillon est infiltré par la résine : mélange (V/V) 2 éthanol/ 1 LR Withe; 2 h à 25°C  
1 éthanol/ 1 LR White; 2 h à 25°C  
1 éthanol/ 2 LR White; 2 h à 25°C  
puis, en LR White pur 1 nuit à 4°C.



**FIGURE 28 B** Incubation de grilles avec des coupes ultrafines.

**Polymérisation** : chaque échantillon est déposé dans une capsule de gélatine remplie de LR White qui est recouverte d'une lamelle de verre afin d'éviter le contact avec l' O<sub>2</sub> et placé à 60°C pendant 5 heures.

3.2.A.3 Marquage : comprend plusieurs étapes successives : saturation, mise en contact avec l'anticorps primaire (2F4), rinçages, anticorps secondaire (couplé à une particule d'or colloïdal), rinçages et coloration. Celles-ci reprises ci-dessous, sont réalisées sur goutte (50 µl). (voir figure 288)

Remarque préliminaire : Le tampon (Tris/Ca/Na) permettant un marquage optimal par le 2F4 est de composition suivante:

Tris	20 mM
CaCl <sub>2</sub>	1 mM
NaCl	150 mM
pH:	8,2

- \* Saturation 1h à 25°C par la poudre de lait à 5%, diluée en tampon Tris/Ca/Na (50 µl)
- \* Incubation de l'anticorps primaire (2F4) une nuit à 4°C. Celui-ci est dilué (20 X) en Tris/Ca/Na, en présence de 1% de poudre de lait et 0,1% de Tween (utilisé afin de réduire la fixation non spécifique).
- \* Rinçages : 3X5 min en Tris/Ca/Na/Poudre de lait/Tween.
- \* Incubation 1h à température ambiante avec l'anticorps secondaire (spécifique du fragment Fc des IgG de souris et couplé à une particule d'or colloïdal). Celui-ci est dilué 20X en tampon Tris/Ca/Na.
- \* Rinçage : 100 ml (en "jet") de tampon Tris/Ca/Na filtré sur 0.2 µm.
- \* Post fixation : 5 min en glutaraldéhyde 3% en tampon PO<sub>4</sub> 0.025 M
- \* Rinçage : 150 ml (en jet) d'H<sub>2</sub>O bidistillée
- \* Coloration : 20 min dans l'acétate d'uranyle 2% en H<sub>2</sub>O.
- \* Rinçage : 150 ml (en jet) d'H<sub>2</sub>O bidistillée

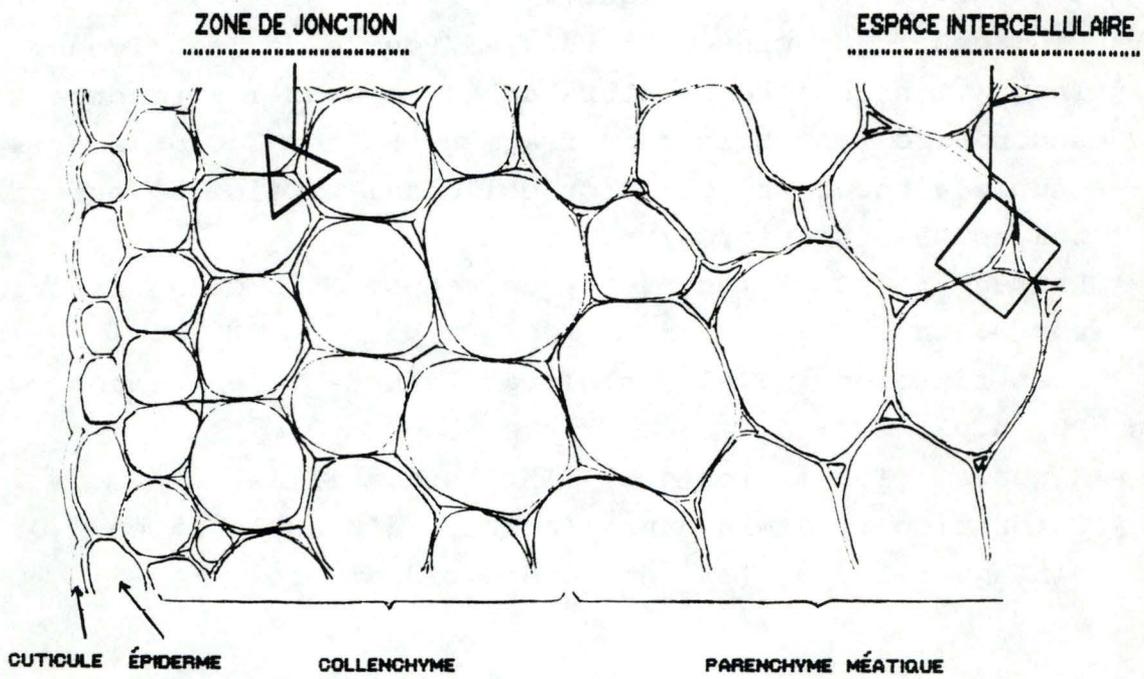


FIGURE 29 : COUPE TRANSVERSALE D'UNE TIGE

3.2.A.4 Déestérification (cette étape précède le marquage) :  
Les pectines sont facilement dégradées. En milieu basique, elles sont susceptibles aux réactions de  $\beta$ -élimination si la température est élevée ou de déestérification aux températures plus basses.

La déestérification des pectines sur les coupes ultrafines a été réalisée en NaOH 50 mM à température ambiante. Après ce traitement, la grille est rincée en H<sub>2</sub>O (100 ml, en jet).

### 3.1.B Résultats

#### 3.1.B.1 Mise au point du protocole de marquage :

Un variant du protocole utilisé au laboratoire pour les marquages des tissus de betterave et de carotte en microscopie électronique (F. Liners) a été initialement testé sur les tissus de pomme de terre en microscopie optique (voir annexe). Celui-ci s'avérant efficace, nous nous sommes alors tournés vers la microscopie électronique.

Nous avons alors testé différentes dilutions (20, 40 et 60 X) pour les anticorps primaires et secondaires. Le marquage optimal est obtenu en les diluant tous deux 20 X.

#### 3.1.B.2 Marquage en ME au niveau des tiges

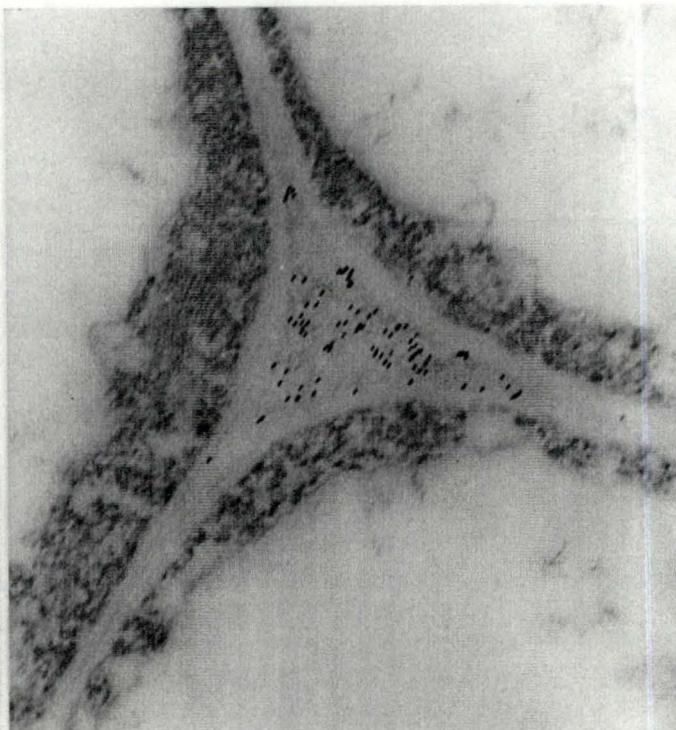
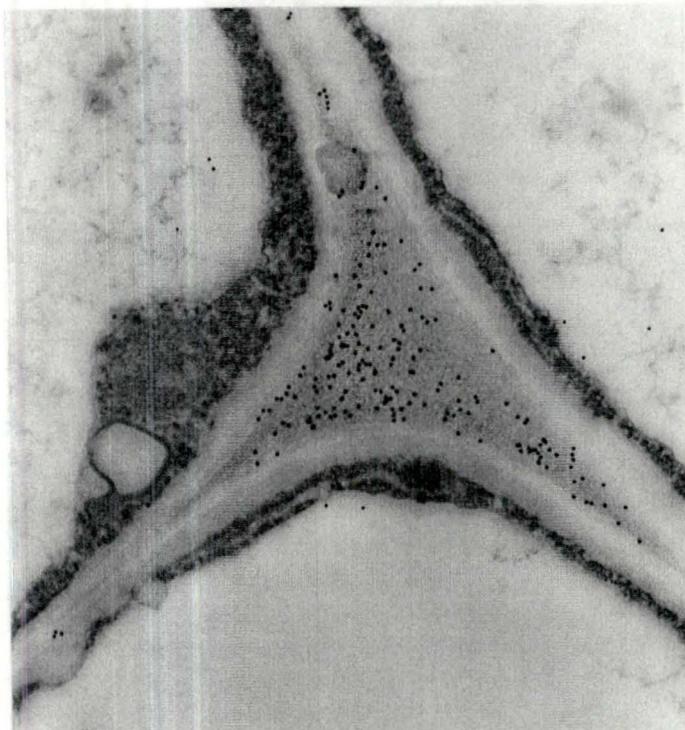
Les coupes transversales montrent différents endroits caractérisés par une topologie particulière.

Parmi ceux-ci, nous nous sommes limités à l'étude des jonctions et des espaces intercellulaires. (voir figure 29)

a- Marquage sans déestérification préalable

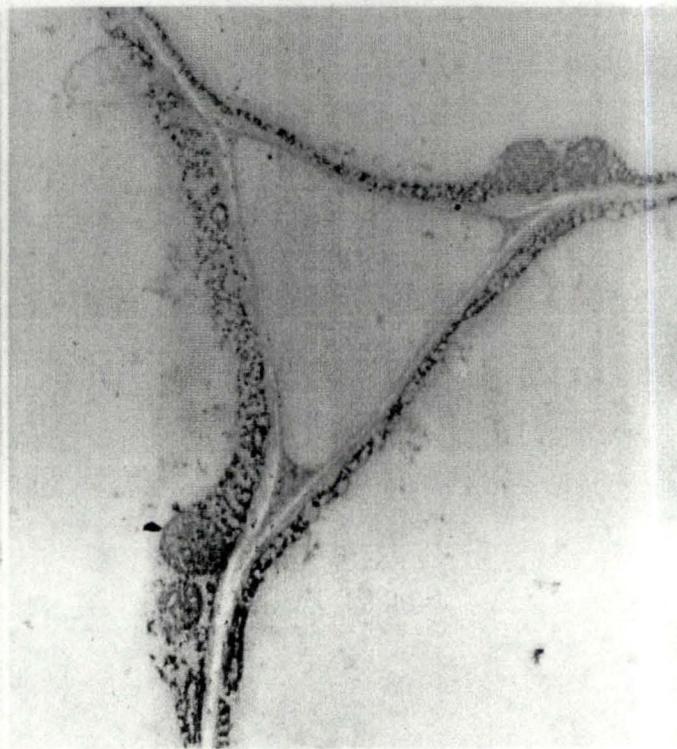
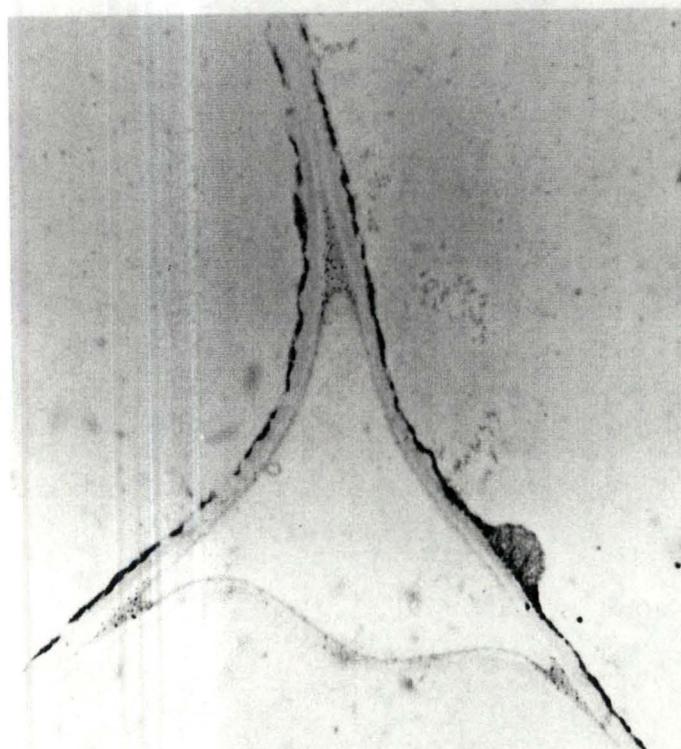
**CHARLOTTE**

**ALPHA**



micrographie 1 : Marquage au 2F4 sans déestérification préalable au niveau d'une zone de jonction sur tige de Charlotte; grossissement : 37500 X

micrographie 2 : Marquage au 2F4 sans déestérification préalable au niveau d'une zone de jonction sur tige d'Alpha; grossissement : 37500 X



micrographie 3 : Marquage au 2F4 sans déestérification préalable au niveau d'un espace intercellulaire sur tige de Charlotte; grossissement : 12375 X

micrographie 4 : Marquage au 2F4 sans déestérification préalable au niveau d'un espace intercellulaire sur tige d'Alpha; grossissement : 12375 X

On remarque que le marquage au niveau des parois elles-mêmes est pratiquement absent, signe de la présence d'une pectine très estérifiée et cela même au niveau de la lamelle mitoyenne (qui apparaît de couleur plus foncée).

Cependant, un marquage plus important apparaît au niveau des zones de jonction et des espaces intercellulaires. Celui-ci semble plus faible chez le cultivar Alpha par comparaison à Charlotte.

Deux explications sont possibles : soit Alpha contient moins de pectine dans ses parois, soit la pectine d'Alpha est plus estérifiée (ce qui l'empêche d'adopter la configuration reconnue par le 2F4). La déestérification permettra de répondre à cette question.

#### **b- Marquage après déestérification**

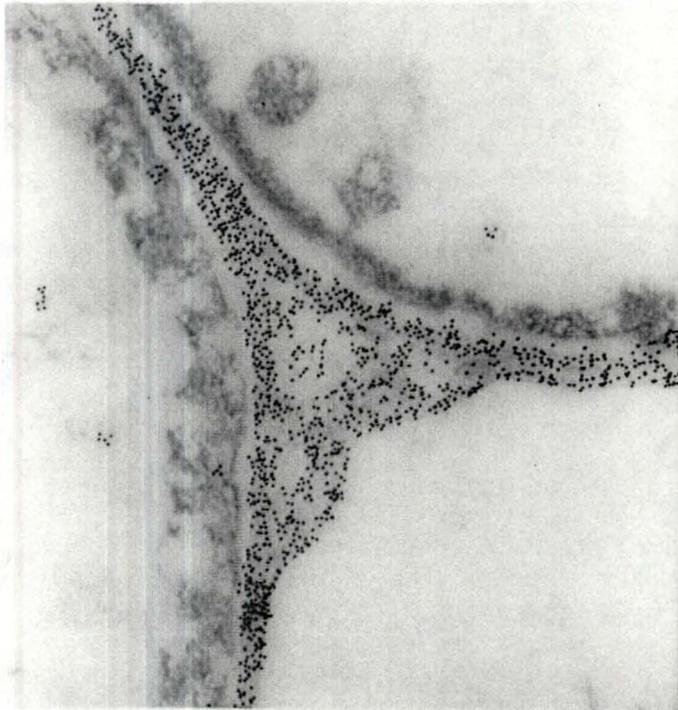
La déestérification par traitement alcalin (NaOH 50 mM) à température ambiante libère les fonctions carboxyliques précédemment méthylées. Ces fonctions seront alors disponibles pour s'associer avec les ions calcium et prendre la conformation spécifiquement reconnue par le 2F4.

Différents temps de déestérification ont été testés :

7,5 15 30 et 60 minutes.

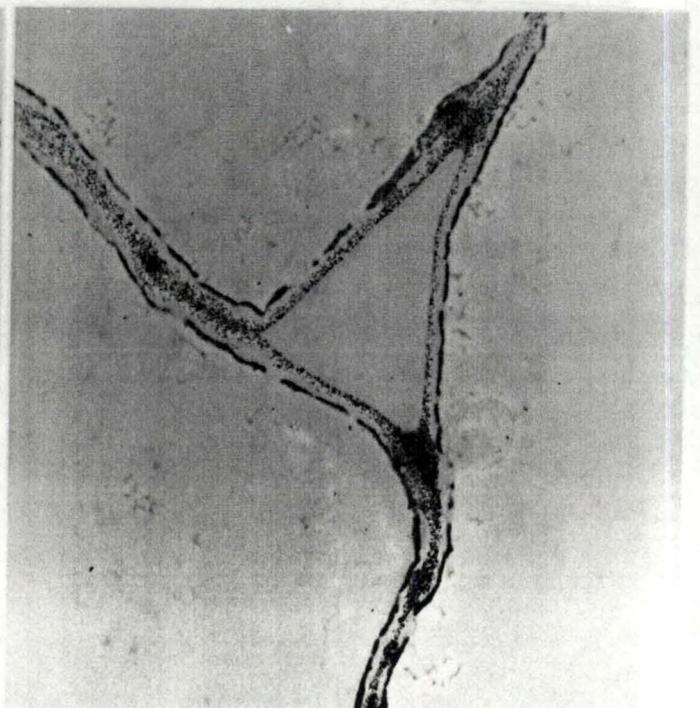
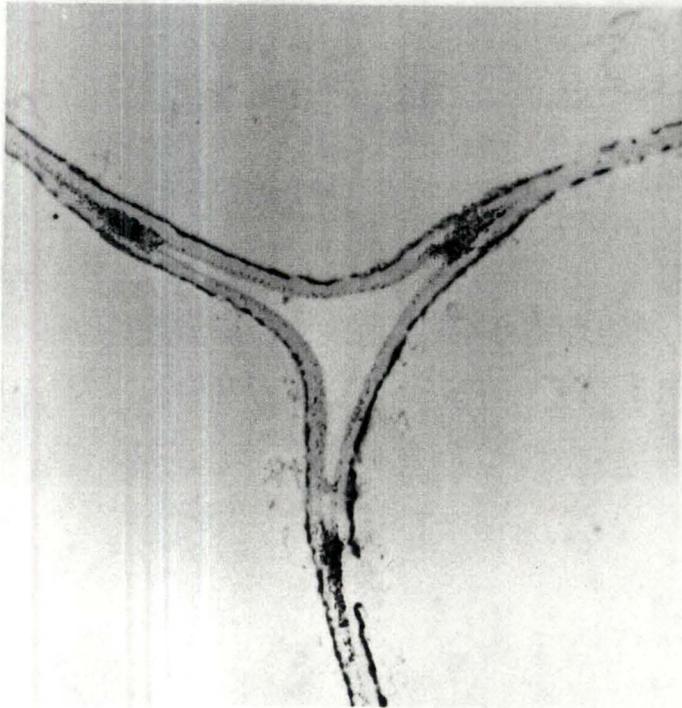
### CHARLOTTE

### ALPHA



micrographie 6 : Marquage au 2F4 après déestérification (7,5 min en NaOH 50 mM) au niveau d'une zone de jonction sur tige de Charlotte; grossissement : 37500 X

micrographie 6 : Marquage au 2F4 après déestérification (7,5 min en NaOH 50 mM) au niveau d'une zone de jonction sur tige d'Alpha; grossissement : 37500 X

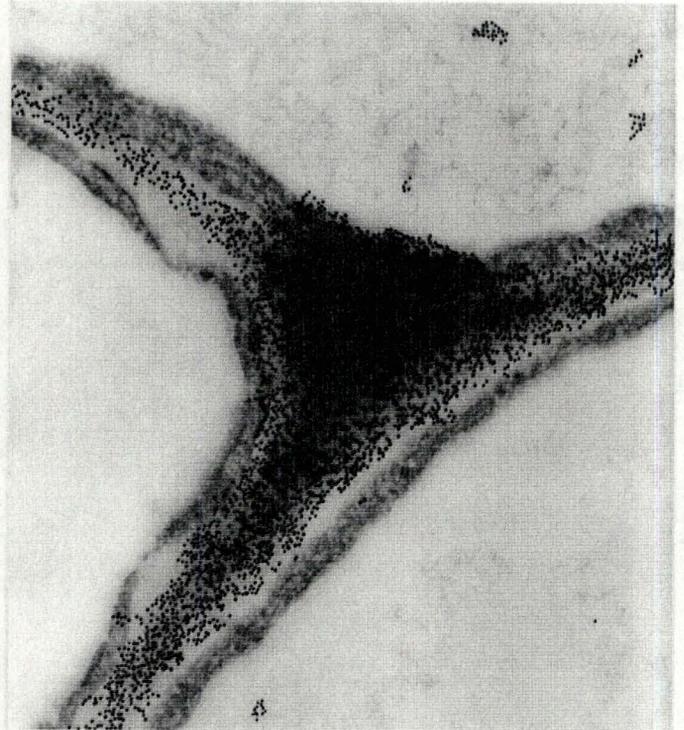
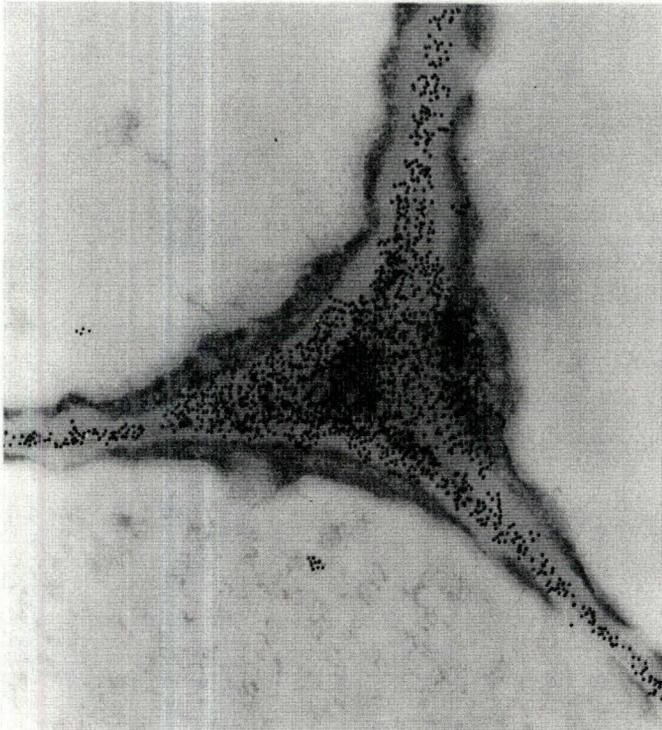


micrographie 7 : Marquage au 2F4 après déestérification (sur gille, 7,5 min en NaOH 50 mM) au niveau d'un espace intercellulaire sur tige de Charlotte; grossissement : 12375 X

micrographie 8 : Marquage au 2F4 après déestérification (sur grille, 7,5 min en NaOH 50 mM) au niveau d'un espace intercellulaire sur tige d' Alpha; grossissement : 12375 X

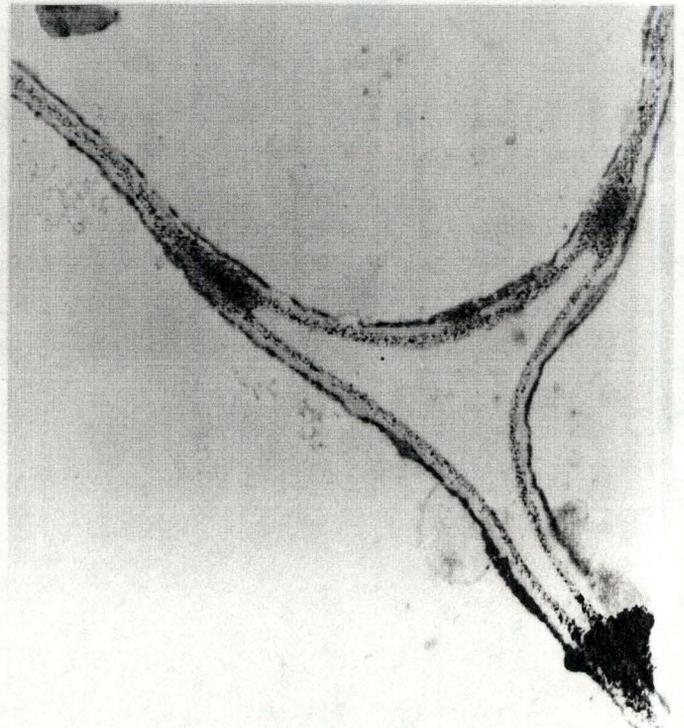
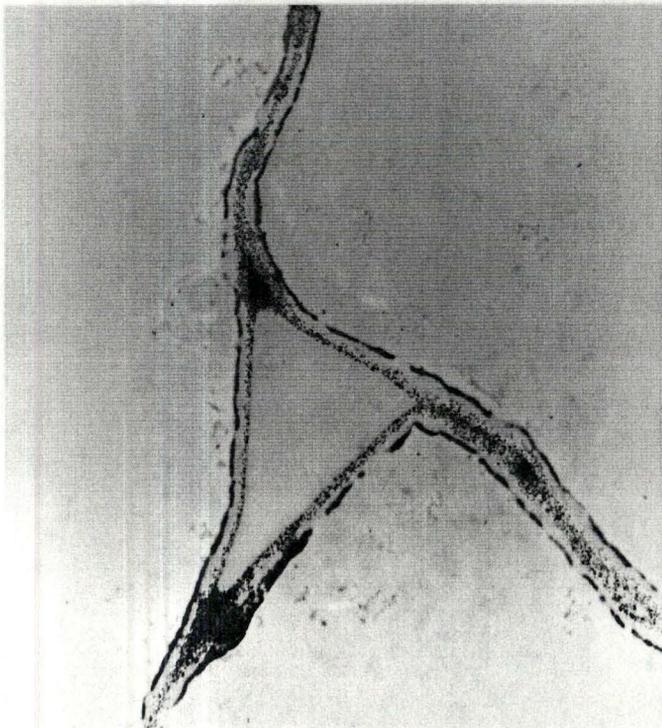
## CHARLOTTE

## ALPHA



micrographie 9 : Marquage au 2F4 après déestérification (sur grille, 15 min en NaOH 50 mM) au niveau d'une zone de jonction sur tige de Charlotte; grossissement : 37500 X

micrographie 10 : Marquage au 2F4 après déestérification (15 min en NaOH 50 mM) au niveau d'une zone de jonction sur tige d' Alpha; grossissement : 37500 X



micrographie 11 : Marquage au 2F4 après déestérification (sur grille, 15 min en NaOH 50 mM) au niveau d'un espace intercellulaire sur tige de Charlotte; grossissement : 12375 X

micrographie 12 : Marquage au 2F4 après déestérification (sur grille, 15 min en NaOH 50 mM) au niveau d'un espace intercellulaire sur tige d'Alpha; grossissement : 12375 X

Pour des temps de déestérification plus longs, le marquage apparaît beaucoup moins spécifique, conséquence d'une réaction indésirable : la  $\beta$ -élimination.

Les fragments pectiques ainsi libérés sont alors délocalisés sur la coupe.

Ci-dessous, une vue de ce phénomène particulièrement important sur les tissus du cultivar Alpha (qui semble présenter un contenu plus important en pectine).



micrographie 13 : Marquage au 2F4 après déestérification (sur grille, 60 min en NaOH 50 mM) sur tige d'Alpha. Vue plus générale. Grossissement : 7800 X

c- **Commentaires** : la déestérification fait donc apparaître pour les deux cultivars un marquage très intense au niveau des zones de jonction, des espaces intercellulaires et des parois, celui-ci s'accroît avec le temps de déestérification en même temps qu'il devient plus délocalisé. Cependant, le marquage semble également plus intense sur les tissus du cultivar Alpha.

Afin de quantifier nos observations, nous avons estimé l'intensité des différents marquages par comptage des particules d'or par unité de surface ( $\mu\text{m}^{-2}$ ), comptages réalisés pour des raisons pratiques au niveau des zones de jonction et pour des temps de déestérification de 7.5 et 15 min (les traitements plus longs faisant apparaître une délocalisation du marquage).

Données chiffrées :

temps (min) de déestérification	intensité du marquage (part.d'or $\mu\text{m}^{-2}$ )	
	Alpha tige	Charlotte tige
0	163	207
7,5	1627	1080
15,0	3402	2515

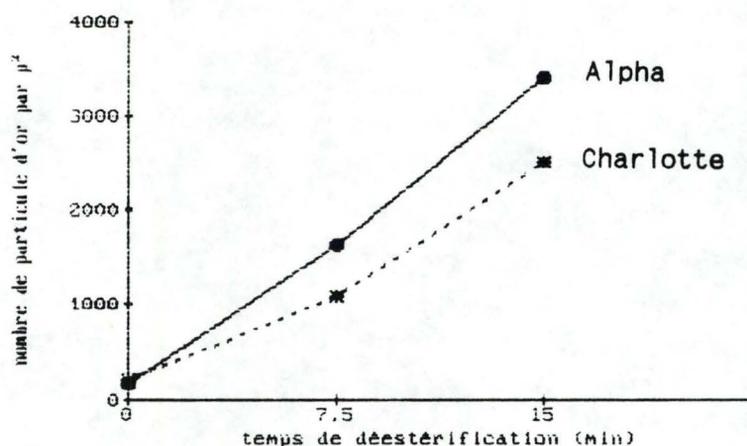


Figure 30 : évolution de l'intensité du marquage au niveau des zones de jonction des tiges en fonction du temps (min) de déestérification (en NaOH 50 mM), selon le cultivar Alpha ou Charlotte (tige). L'intensité a été évaluée par un comptage des particules d'or par unité de surface ( $\mu\text{m}^{-2}$ )

Le DE étant défini comme la proportion d'acides galacturoniques méthylestérifiés pour 100 acides galacturoniques totaux, il est donc nécessaire de comparer les intensités de marquage avant et après traitement alcalin, ceci nous donne :

Evaluation de la quantité de pectine (au niveau des zones de jonction) par l'intensité du marquage observé exprimée en nombre de particules d'or par unité de surface ( $\mu\text{m}^{-2}$ )

	<b>Alpha</b>	<b>Charlotte</b>
<u>pectine acide</u> (PA)	: 163	207
<u>pectine estérifiée</u> (PE)	: 3339	2308
<u>pectine totale</u> (PT)	: 3402	2515

Evaluation du DE des pectines (des zones de jonction)

	<b>Alpha</b>	<b>Charlotte</b>
DE = PE/PT *100	: : 98 %	: 92 %

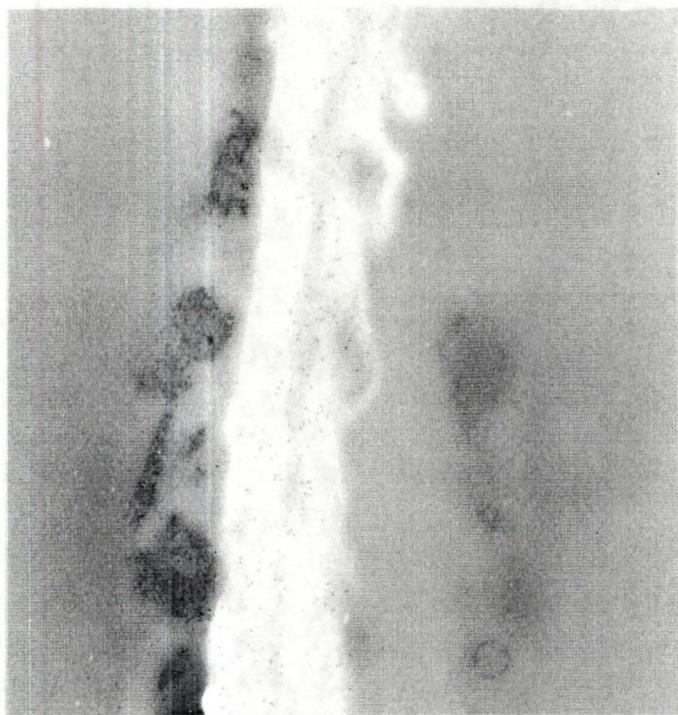
Ces calculs nous permettent de montrer que d'une part la quantité de pectine et que d'autre part le degré d'estérification sont plus faibles chez le cultivar Charlotte par comparaison à Alpha. De plus, ils montrent que la quantité totale de pectine estérifiée est environ 1,4 X plus élevée chez Alpha.

### 3.2.B.3 Marquage en ME au niveau des tubercules

Les problèmes rencontrés en résine LR White sur les tubercules n'ont pas pu être surmontés. La mauvaise inclusion des grains d'amidon extrêmement durs a provoqué la présence de "trous" (voir photo annexe 2 page 73) apparaissant lors de la coupe, ceux-ci ont rendu les observations au microscope électronique particulièrement difficiles. De plus, les cellules étant très grandes, la proportion des parois observables en microscopie électronique (ME) était très faible.

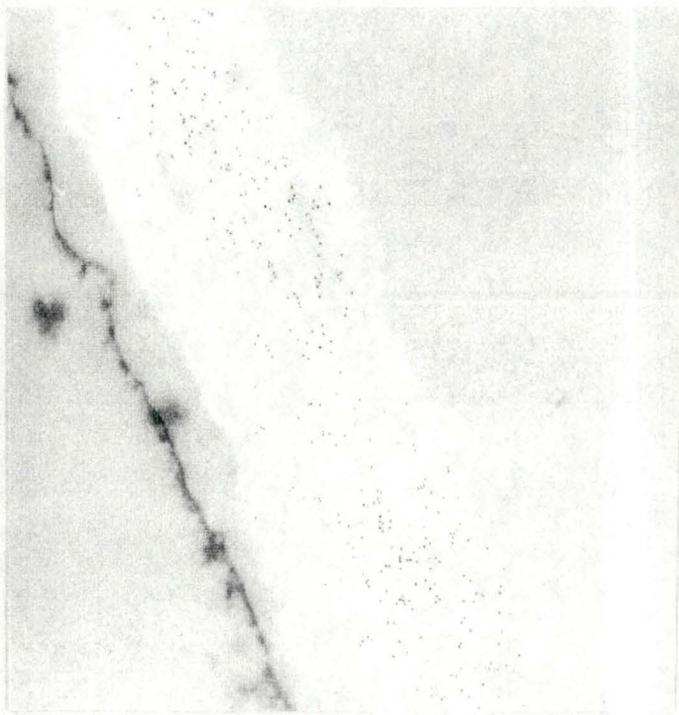
Nous avons procédé de la même manière que pour les tiges, observant le marquage avant et après déestérification. Cependant, face aux difficultés rencontrées, nous nous sommes limités à un temps de déestérification (NaOH 50 mM) de 30 minutes.

## CHARLOTTE



micrographie 14 : Marquage au 2F4 sans déestérification préalable au niveau d'une paroi sur tubercule de Charlotte grossissement : 15600 X

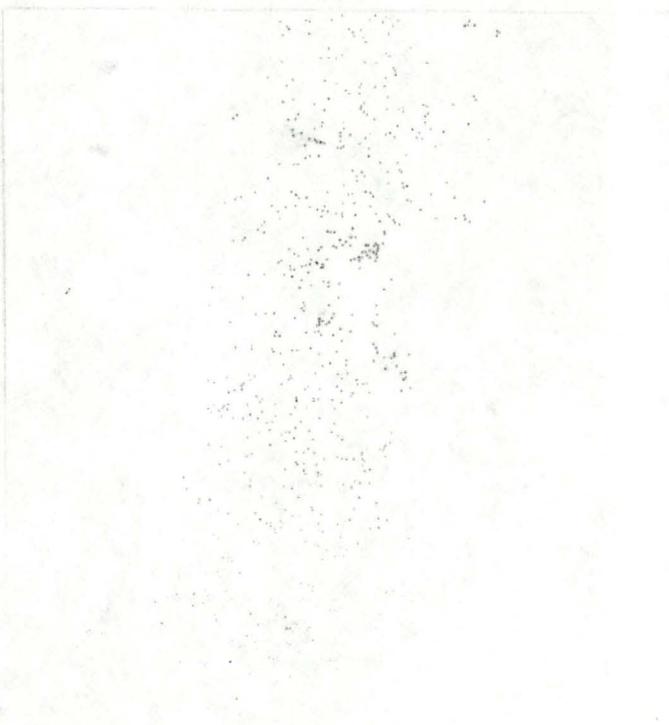
## ALPHA



micrographie 15 : Marquage au 2F4 sans déestérification préalable au niveau d'une paroi sur tubercule d'Alpha grossissement : 25200 X



micrographie 16 : Marquage au 2F4 après déestérification (sur grille, 30 min en NaOH 50 mM) au niveau d'une paroi sur tubercule de Charlotte; grossissement : 15600 X



micrographie 17 : Marquage au 2F4 après déestérification (sur grille, 30 min en NaOH 50 mM) au niveau d'une paroi sur tubercule d'Alpha; grossissement : 25200 X

**a Marquage sans déestérification préalable :**

Une première constatation s'impose: les parois des tubercules, contrairement aux tiges (voir page 43), sont marquées sans qu'un traitement préalable de déestérification n'ait été appliqué.

D'autre part, ce marquage semble uniformément réparti sur la largeur des parois. Du point de vue de l'intensité, celui-ci semble quelque peu plus intense chez le cultivar Alpha.

**b Marquage après déestérification :**

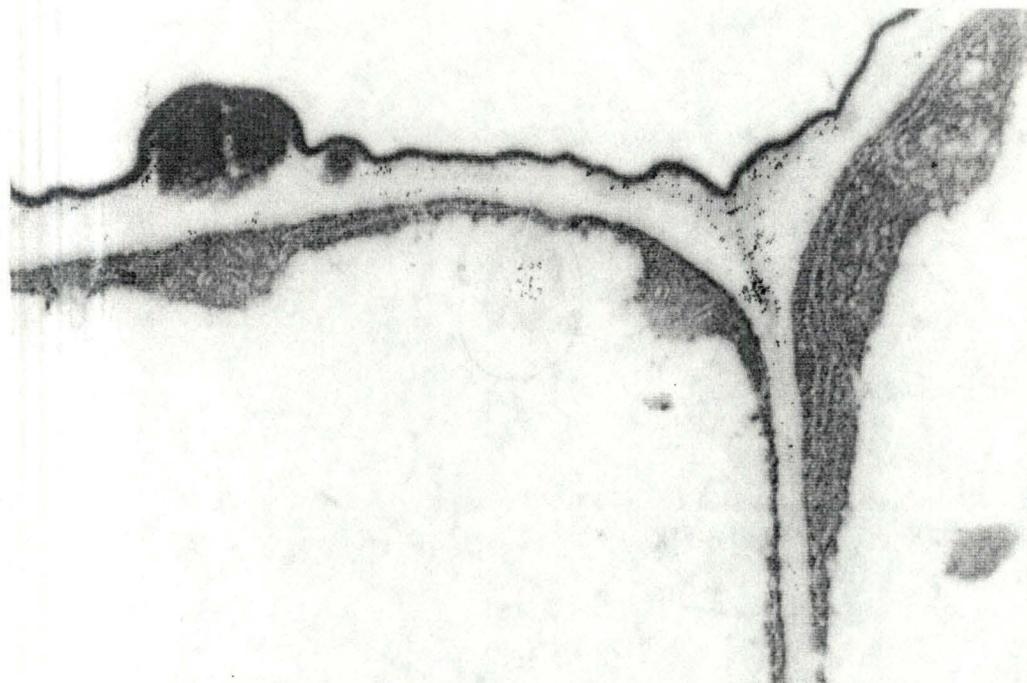
L'intensité du marquage ne présente pas de différence frappante entre les deux cultivars. Ces résultats ne peuvent montrer l'existence de différences selon le cultivar au niveau de la répartition des pectines dans les parois comme au niveau de leur taux d'estérification.

**3.2.B.4 Remarque générale**

Nous avons observé au niveau des tiges la présence de nombreuses vésicules de grande taille ( $\pm 100\mu\text{m}$ ) qui s'invaginent dans la vacuole. Certaines d'entre elles apparaissent en continuité avec la MP.

L'une de ces vésicules sur un tissu déestérifié par un traitement alcalin (NaOH 50 mM) de 7.5 min, présente un marquage spécifique, signe de la présence de polymères pectiques.

Voir page suivante



micrographie 18: Marquage au 2F4 sur tige du cultivar Charlotte après 7.5 min de déestérification en NaOH 50 mM ; grossissement : 19800 X

Une telle structure pourrait correspondre à une vésicule d'endocytose, cette observation constituant un argument pour la théorie du turn over des composants de la paroi.

L'endocytose a été démontrée pour les protoplastes, les cellules en suspension et les cellules au sein d'un tissu par l'utilisation d'une molécule dense aux électrons (Lucifer Yellow) incapable de traverser la membrane plasmique et que l'on retrouve dans la vacuole. Les mécanismes et les différentes étapes de l'endocytose ne sont pas connus.

D'autre part, l'existence d'un turn over a été démontrée chez les parois de fibre de coton en développement par l'observation de la diminution de la quantité d'acides uroniques et de protéines au cours du temps.

Cependant, même si d'une part on reconnaît l'existence d'un turn over des constituants de la paroi et que d'autre part la réalité des mécanismes d'endocytose ne fait plus de doutes, l'endocytose des polysaccharides de la paroi n'a jamais été démontrée.

### 3.2.B.5 Résumé :

L'analyse des marquages immunologiques de la pectine en M.E. nous a permis de montrer que le cultivar Alpha possède une pectine plus estérifiée qui est présente en quantité beaucoup plus importante (environ 1.4 X plus de pectine) par comparaison au cultivar Charlotte. D'autre part, les tubercules, pour lesquels il n'existe pas de différence de sensibilité entre les deux cultivars n'a pas été établie (Gabra J. & Lepoivre Ph. , communication personnelle) ne semblent pas présenter de divergence au niveau de leurs pectines. Ces conclusions sont en accord avec notre hypothèse, à savoir qu'une plus grande résistance au macergène Eca est liée aux caractéristiques de la pectine et plus particulièrement à son DE.

Nous pouvons donc conclure qu'au niveau des tiges, le cultivar Alpha moins sensible au macergène comme aux enzymes secrétées par Eca, est caractérisé par un contenu plus élevé en pectines plus estérifiées.

## **Chapitre 4 : Observation du DE sur les tissus infectés**

---

Les différences constatées au niveau du degré d'estérification de la pectine des deux cultivars Alpha et Charlotte semblent donc pouvoir être mises en parallèle avec la sensibilité à l'infection par le macergène Eca.

Nous avons dans cette dernière étape, observé l'évolution du DE au cours de l'action pectolytique du pathogène dans le tissu, en utilisant comme précédemment, les marquages immunologiques et cela pour les deux cultivars Alpha et Charlotte, tubercules et tiges.

### **4.A Matériel et méthode**

**4.A.1 Croissance du pathogène** : La souche Eca (conservée sur milieu solide) est transférée sur milieu liquide stérile (compositions voir p20) et placée à 25°C.

Les infections sont réalisées après 40 h quand l'optimum de croissance est atteint .(La croissance bactérienne peut être suivie via l'absorbance à 600 nm)

**4.A.2 Mode d'infection des microplantules** : celles-ci, cultivées sur agar en conditions stériles, sont coupées à leur base et infectées par immersion (1 min) dans le milieu contenant les bactéries, puis repiquées individuellement sur milieu de culture. Les plantules infectées sont placées en chambre de culture dans des conditions identiques à celles précédant l'infection. Ce protocole assure le développement rapide de l'infection.

**4.A.3 Mode d'infection des tubercules** : ceux-ci sont coupés (en présence de H<sub>2</sub>O) à l'emporte-pièce (diamètre: 1 cm), puis en rondelles d'environ 2 mm d'épaisseur (en conditions stériles).

rem : Afin d'assurer l'homogénéité de l'échantillonnage, seule la partie centrale des tubercules a été utilisée.

Les rondelles ainsi obtenues sont déposées sur un filtre (stérile) imbibé du milieu contenant les bactéries, lui-même placé dans une boîte de pétri (stérile). Le tout est placé à 25°C et à l'abri de la lumière. Ce protocole assure un rapide développement de l'infection (environ 24 heures sont nécessaires pour une macération complète de l'échantillon).

**4.A.4 Préparation des échantillons pour la ME**

**Fixation** : selon le protocole détaillé page 37

**Enrobage** : en LRW, selon le protocole détaillé page 38

**Marquages** : au 2F4, selon le protocole détaillé page 41

**Déestérification** : par traitement alcalin en NaOH 50 mM, 15 min à température ambiante . Ce traitement permet de déestérifier la pectine en évitant une  $\beta$ - élimination.

## 4.B Résultats

### 4.B.1 Infection au niveau des tiges

Au niveau de ce tissu, les cultivars Alpha et Charlotte montrent une différence importante de résistance face aux macergènes, ce que nous avons rapidement observé.

En effet, après une infection réalisée dans des conditions identiques (cfr protocole d'infection page 55 ), le cultivar Charlotte a rapidement montré les signes du développement de l'infection (cfr introduction page 5 ), alors que le cultivar Alpha semblait encore sain extérieurement.

Après 48 h environ, les tissus de Charlotte présentaient les symptômes de la pourriture. Le même stade chez Alpha n'était atteint qu'après plus de 5 jours.

La ME nous permet d'effectuer des observations précises concernant la pectine et son DE par le marquage immunologique. Cependant, cette technique est fastidieuse, aussi nous avons dû nous limiter à l'analyse de l'infection après un temps important pour chacun des cultivars afin d'observer l'action d'Eca sur les parois :

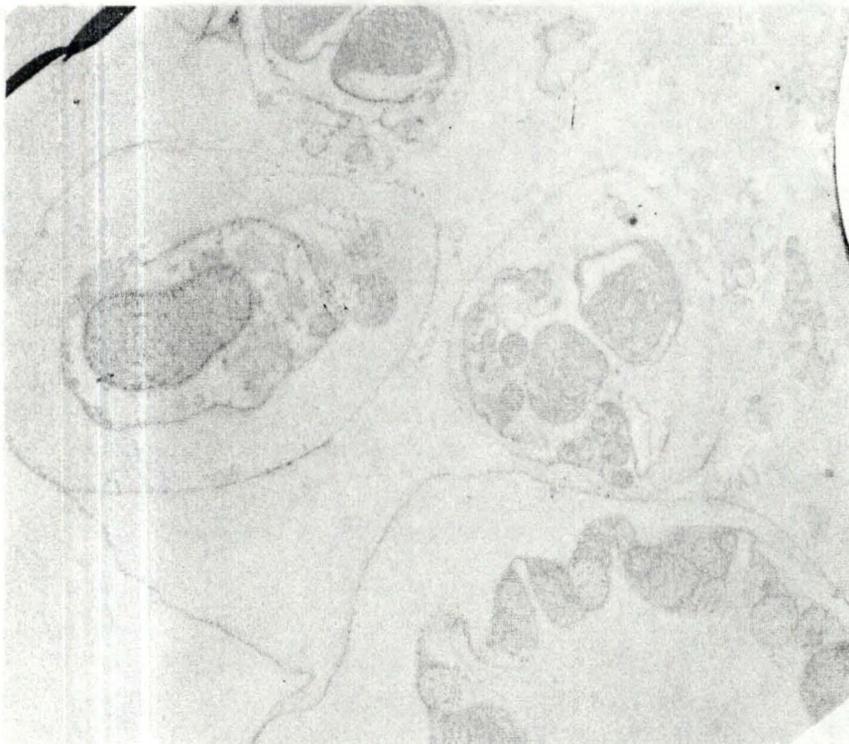
- \* 32 h pour le cultivar Charlotte (tige), stade d'infection caractérisé par la perte de la consistance du tissu, signe d'un stade avancé de macération.
- \* 71 H pour le cultivar Alpha (tige), le tissu ne présentant à ce stade que des signes de flétrissement.

Des raisons pratiques nous ont empêché de considérer des temps d'infection identiques pour les deux cultivars. Ceux-ci seront donc considérés indépendamment.

#### 4.B.1.1 Cultivar Charlotte

Observations 32 h après la mise en contact avec le pathogène.

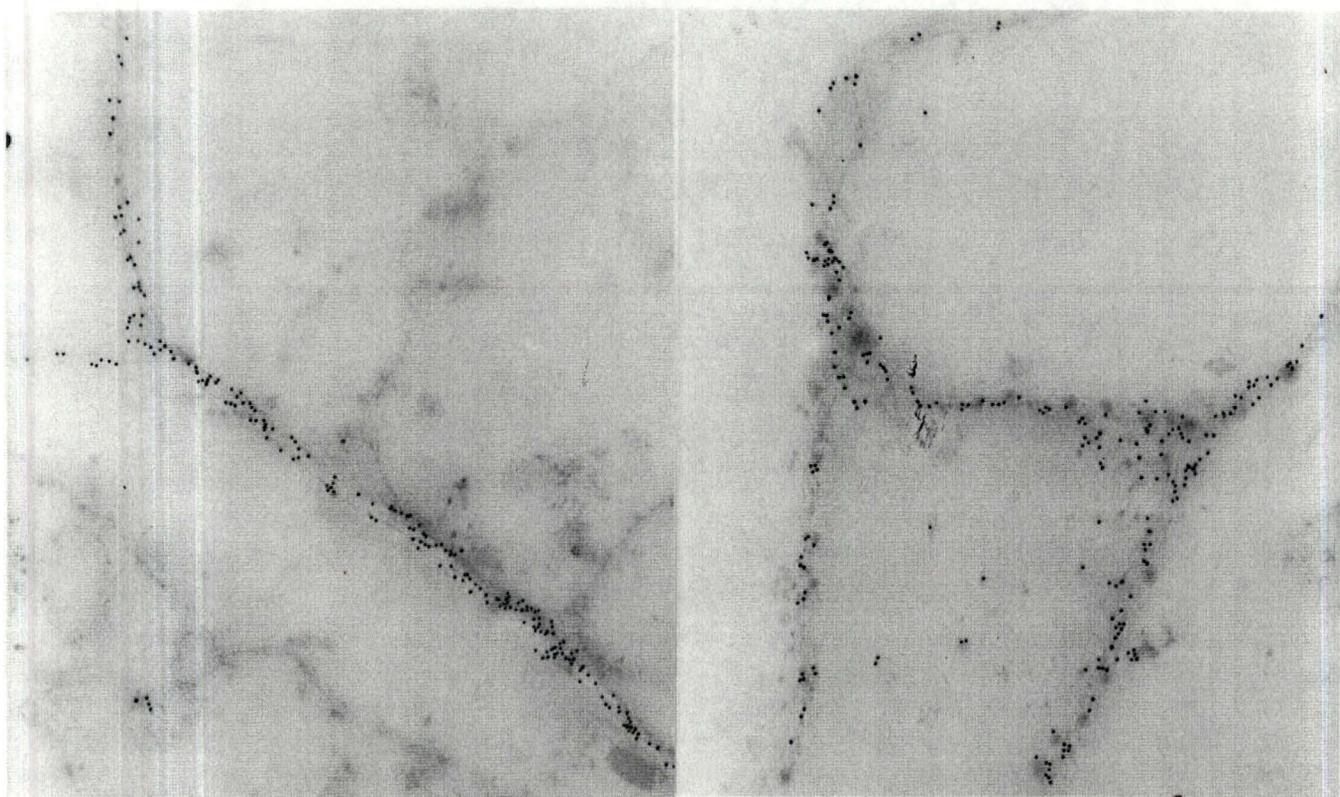
##### 4.B.1.1.a Vue générale des structures



micrographie 19: vue générale en microscopie électronique des tiges du cultivar Charlotte infectées (32 h après la mise en contact de la plantule avec le pathogène); grossissement : 3300 X

On observe un tissu complètement désorganisé dans lequel seuls des vestiges de parois subsistent et où les cellules plasmolysées sont sous forme protoplastique; ces caractéristiques correspondent à la définition de la macération. D'autre part, on ne remarque pas ici la présence des bactéries, qui ne sont en fait que peu nombreuses.

4.B.1.1.b DE de la pectine au sein du tissu infecté



micrographie 19b: Marquage au 2F4 sans déestérification préalable au niveau d'une paroi sur tige de charlotte infectée (32 h après la mise en contact avec Eca); grossissement : 37500 X

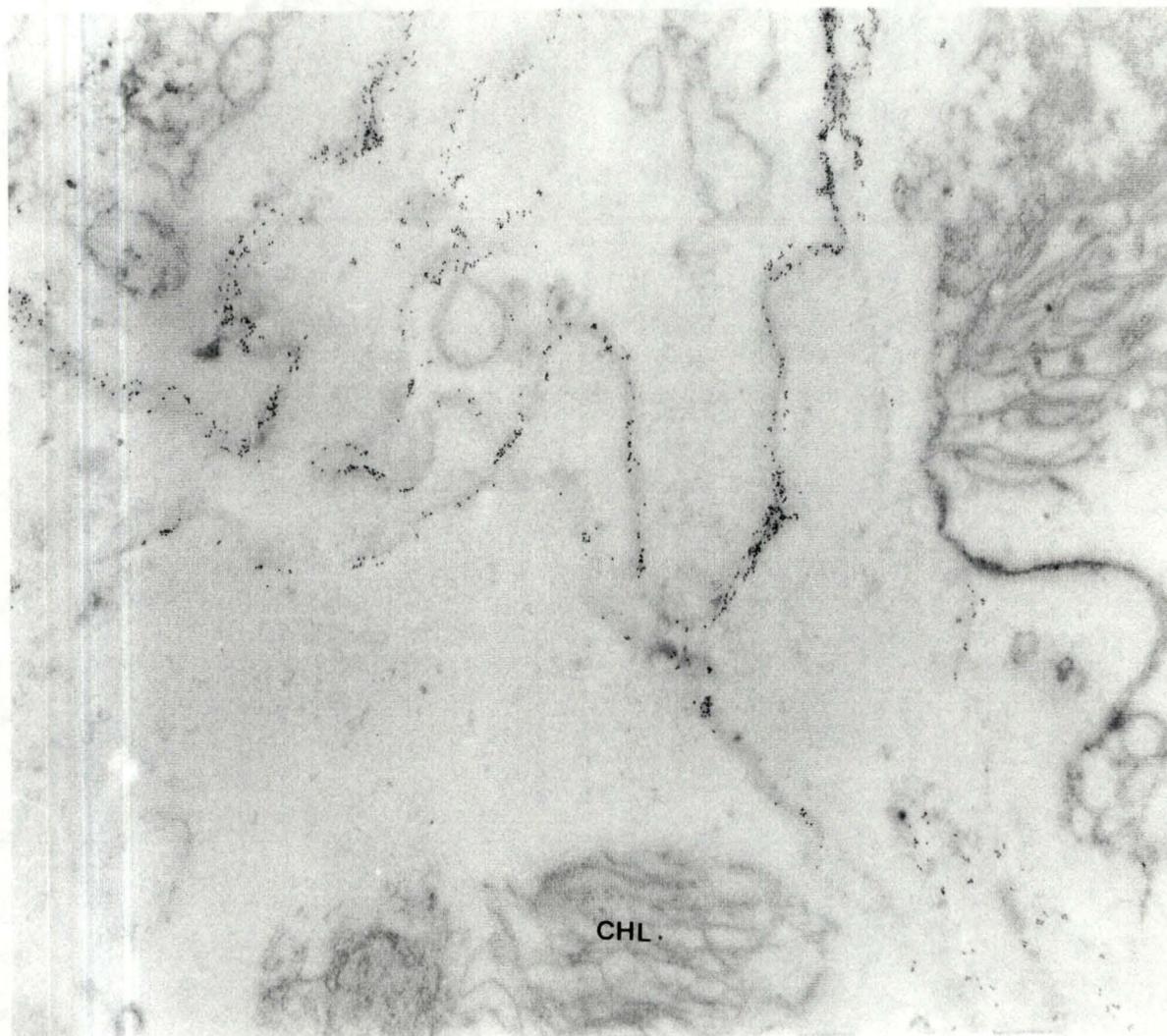
micrographie 20 : Marquage au 2F4 après déestérification (sur grille, 15 min en NaOH 50 mM) au niveau d'une paroi sur tige de charlotte infectée (32 h après la mise en contact avec Eca); grossissement : 37500 X

On constate la présence d'un marquage des "parois" qui apparaît avant le traitement de déestérification (déjà visible sur la micrographie 21). Or, nous avons constaté précédemment que les parois des tiges non infectées ne contenaient que très peu de pectine acide.

D'autre part, une déestérification en NaOH 50 mM ne fait pas apparaître un marquage plus important, le DE de la pectine dans les tissus infectés est donc très faible.

Ces observations indiquent que la quantité de pectine ainsi que son taux d'estérification ont diminué après 32 h d'infection par Eca sur les tissus du cultivar Charlotte.

4.B.1.1.c Visualisation des parois par marquage



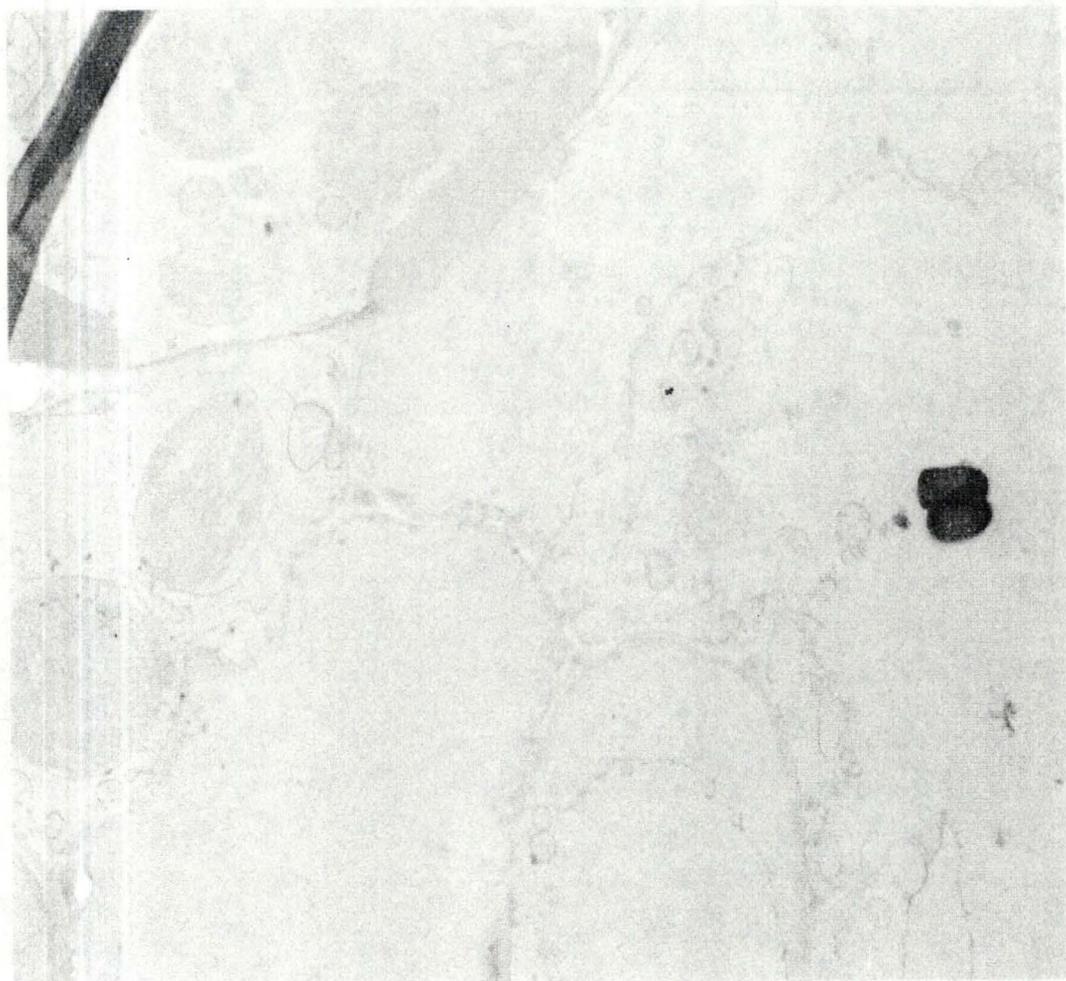
micrographie 21 : Vue générale en microscopie électronique des tissus de Charlotte infectés (32 h après la mise en contact avec Eca) et marqués au  $^{252}\text{F}_4$  sans déstérification préalable, qui nous permet de mieux distinguer les parois. Grossissement : 3300 X

Le marquage de la pectine permet de mieux visualiser les parois qui apparaissent complètement désorganisées et sans cohésion. D'autre part, on observe également, outre la plasmolyse, la désorganisation des thylacoïdes au sein des chloroplastes (CHL.)

#### 4.B.1.2 Cultivar Alpha

Observations après 71 heures d'infection.

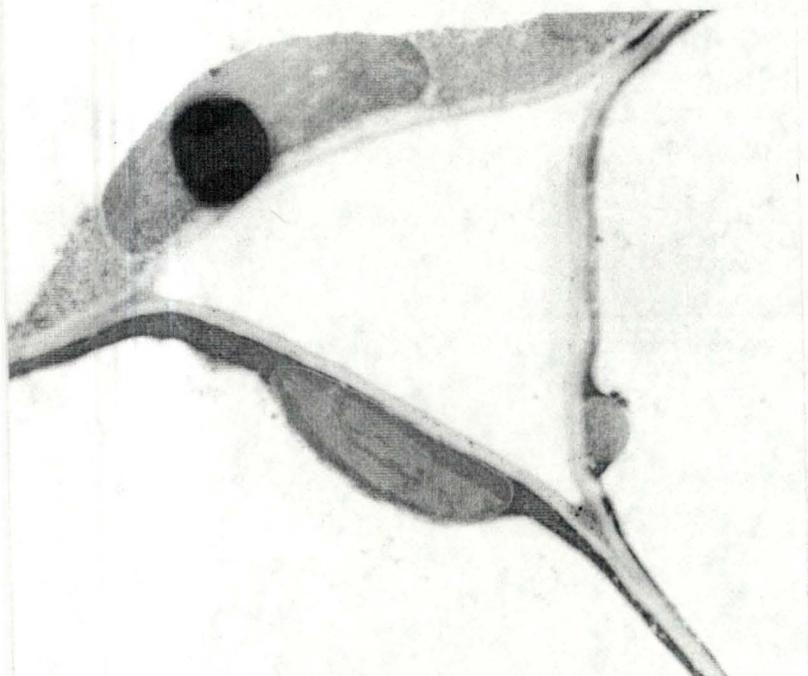
##### 4.B.1.2.a Vue générale des structures



micrographie 22 : Vue générale en microscopie électronique des  
tissus d'Alpha tige infectés (71 h après la mise en contact avec Eca)  
Grossissement : 6000 X

Le tissu n'apparaît que très peu désorganisé, les parois semblant intactes après un temps d'infection pourtant élevé (71 heures), malgré la présence des bactéries.

4.B.1.2.b DE de la pectine au sein du tissu infecté



micrographie 25 : Marquage au 2F4 non précédé d'une déestérification (sur grille, 15 min en NaOH 50 mM) au niveau d'un espace intercellulaire sur tige d'Alpha infectée (71 h après la mise en contact avec Eca); grossissement : 12375 X



micrographie 23 : Marquage au 2F4 après déestérification (sur grille, 15 min en NaOH 50 mM) au niveau d'un espace intercellulaire sur tige d'Alpha infectée (71 h après la mise en contact avec Eca); grossissement : 12375 X



micrographie 24 : Marquage au 2F4 après déestérification (sur grille, 15 min en NaOH 50 mM) au niveau d'une jonction sur tige d'Alpha infectée (71 h après la mise en contact avec Eca); grossissement : 37500 X

Les parois et les espaces intercellulaires non déestérifiés ne sont marqués que faiblement. D'autre part, 15 min de traitement alcalin ne font apparaître qu'un marquage de faible intensité si on le compare à celui obtenu sur les tissus non infectés (voir micrographies 9→12). Ces observations indiquent que la quantité totale de pectine ainsi que son DE ont diminué après 71 h d'infection.

#### 4.B.2 Infection au niveau des tubercules

La différence de sensibilité qui apparaît au niveau des tiges entre les deux cultivars Alpha et Charlotte n'a pas été mise en évidence au niveau des tubercules. (Gabra et al, 1990).

Nous n'avons pas observé de différence dans la mise en place de l'infection, la macération complète des tissus étant obtenue après 24 h, et cela pour les deux cultivars.

Afin d'étudier l'effet pectolytique d'Eca, les tissus ont été fixés 6 et 12 h après la mise en contact avec le pathogène.

Les polymères pectiques ont été étudiés comme précédemment par marquage immunologique en microscopie électronique.

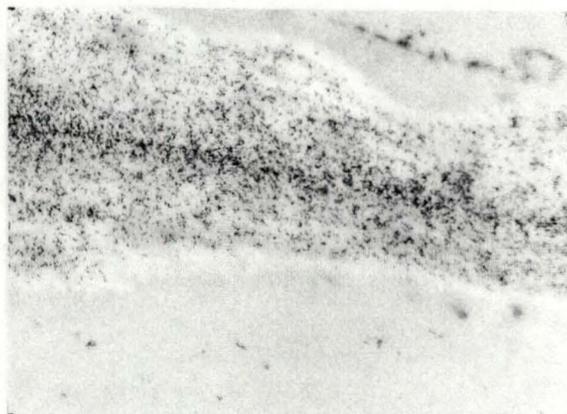
Les marquages de la pectine ont donc été réalisés sur coupes ultrafines sans et avec déestérification (par un traitement alcalin identique à celui appliqué précédemment sur les tubercules non infectés : NaOH 50 mM 30 min à température ambiante).

La dégradation tissulaire comprend non seulement la lyse des composés pectiques, mais également la désorganisation du cytoplasme : plasmolyse, synthèse de mélanine et de subérine (Fox et al, 1972), ces symptômes ont également été observés.

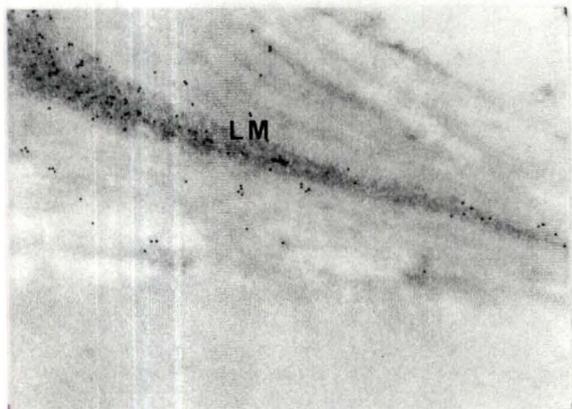
#### 4.B.2.a Après 6 h d'infection



micrographie 26 : Marquage au 2F4 sans déestérification préalable au niveau d'une paroi sur tubercule d'Alpha infecté après 6 h; grossissement : 15600 X



micrographie 27 : Marquage au 2F4 après déestérification (NaOH 50 mM) au niveau d'une paroi sur tubercule d'Alpha infecté après 6 h; grossissement : 15600 X



micrographie 28 : Marquage au 2F4 sans déestérification préalable au niveau d'une paroi sur tubercule de Charlotte infecté après 6 h; grossissement : 19800 X



micrographie 29 : Marquage au 2F4 après déestérification (NaOH 50 mM) au niveau d'une paroi sur tubercule de Charlotte infecté après 6 h; grossissement : 19800 X



micrographie 30 : Vue du pathogène (Eca) présent au sein de la paroi d'un tubercule infecté depuis 6 h (var Alpha); grossissement : 25200 X

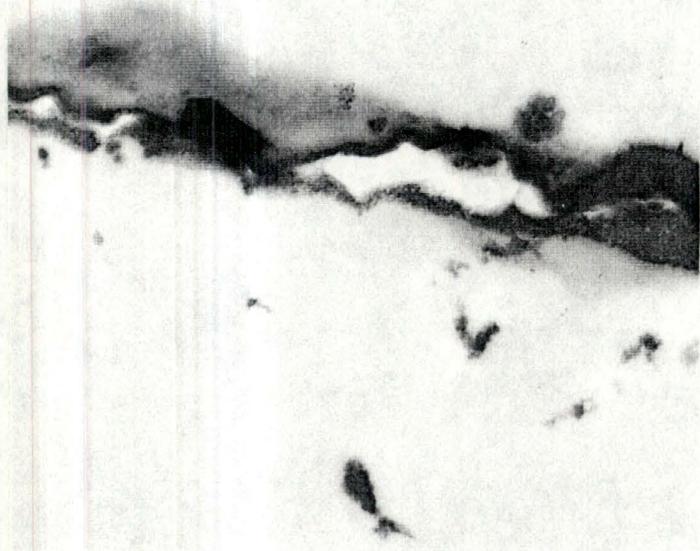
Les parois des tubercules des cultivars Alpha et Charlotte présentent des marquages très différents.

Le marquage sans déestérification préalable semble caractéristique de la lamelle mitoyenne (L.M.) (qui apparaît de couleur plus foncée) dans le cas du cultivar charlotte, le cultivar Alpha présentant un marquage moins localisé.

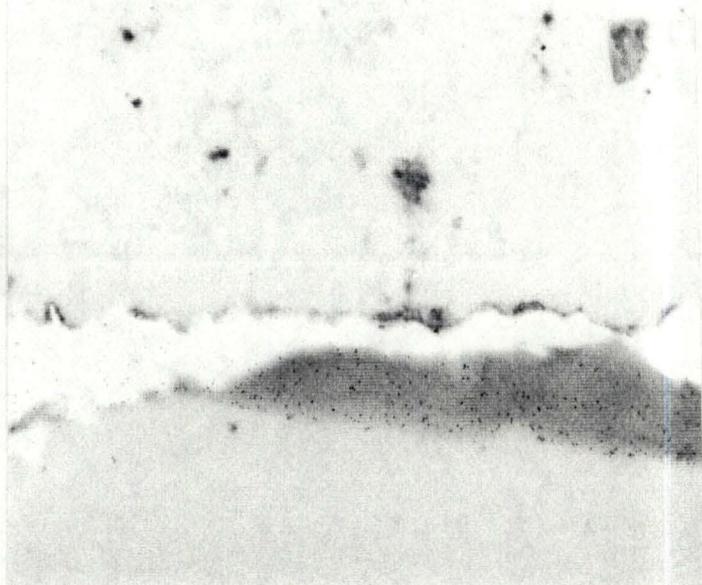
Le marquage après déestérification est uniformément réparti sur l'épaisseur de la paroi d'Alpha en présentant toutefois une intensité plus grande au niveau de la lamelle mitoyenne (LM), tandis qu'il semble être y être concentré pour les parois de Charlotte. En effet, le marquage observé semble résulter d'une délocalisation de la pectine qui est caractéristique d'une réaction indésirable la,  $\beta$ -élimination, déjà observée précédemment au niveau des tiges et conséquence d'un traitement alcalin trop long. Il serait nécessaire pour vérifier cette hypothèse, de tester des temps de déestérification plus courts. Cependant, suite aux difficultés rencontrées sur ces tissus, cette expérience n'a pu être réalisée.

Ces résultats sont très différents de ceux obtenus sur les mêmes tissus non infectés (voir pages 42-49). Cependant, nous ne pouvons conclure que ce phénomène est une conséquence de l'infection en raison de la mauvaise qualité des parois des tissus non infectés.

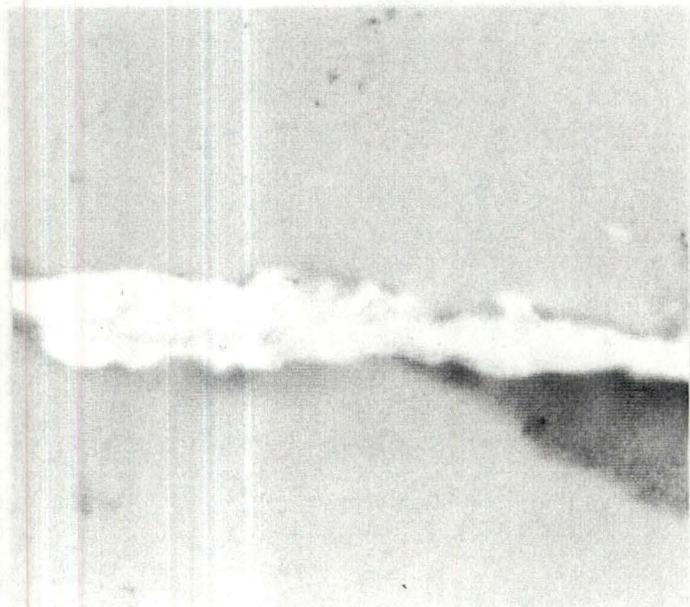
4.B.2.b Après 12 h d'infection



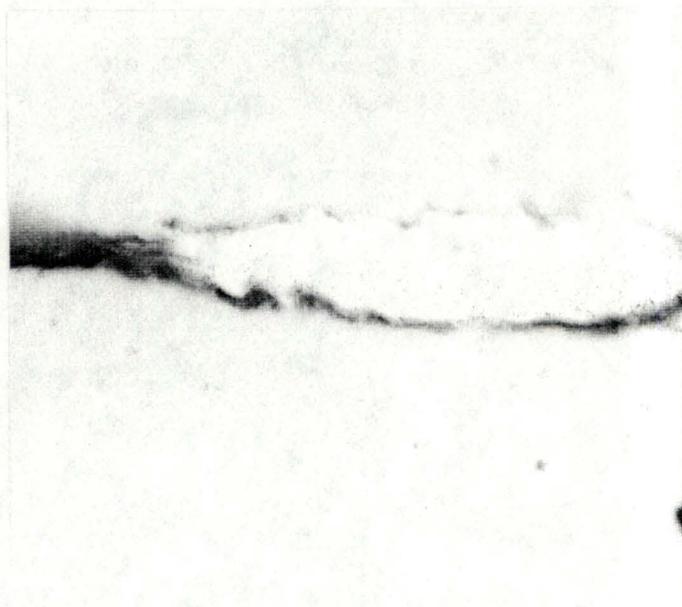
micrographie 31 : Marquage au 2F4 sans déestérification préalable au niveau d'une paroi sur tubercule d'Alpha infecté (12 h); grossissement : 15600 X



micrographie 32 : Marquage au 2F4 après déestérification (sur grille, 30 min en NaOH 50 mM) au niveau d'une paroi sur tubercule d'Alpha infecté (12 h) grossissement : 15600 X



micrographie 33 : Marquage au 2F4 sans déestérification préalable au niveau d'une paroi sur tubercule de Charlotte infecté (12 h); grossissement : 15600 X



micrographie 34 : Marquage au 2F4 après déestérification (sur grille, 30 min en NaOH 50 mM) au niveau d'une paroi sur tubercule de Charlotte infecté (12 h) grossissement : 15600 X

Les parois des tubercules 12 h après la mise en contact avec le pathogène paraissent avoir perdu leur cohésion et cela pour les deux cultivars.

Le marquage de la pectine est pratiquement absent sur les tissus non déstérifiés. Cependant, la déstérification nous révèle la présence de polymères pectiques au sein de la paroi. Ces observations montrent que les parois des tubercules infectés conservent un DE élevé, ce qui n'était pas observé au niveau des tiges infectées (voir page 63).

#### 4- Remarque générale

Le marquage par le 2F4 sur les tiges et les tubercules infectés révèle une particularité d'Eca. Cette bactérie phytopathogène est dotée de flagelles qui apparaissent marqués.



Micrographie : marquage au 2F4 sur tubercule, cultivar Charlotte, tissus non déstérifié; grossissement:

La présence d'un tel marquage spécifique des polymères pectiques indiquerait donc une adsorption de ceux-ci sur les flagelles bactériens. Cependant, nous n'avons retrouvé aucune indication à ce sujet dans la littérature. Les questions du comment et du pourquoi d'une telle propriété mériteraient des études approfondies.

#### 4.B.4 Résumé

Nous avons observé au niveau des tiges la dégradation de la pectine par les enzymes secrétés par Eca, ce qui était attendu. D'autre part, la pectine encore présente au sein du tissu n'est que peu estérifiée. Ceci montre que le pathogène est capable de modifier le DE des pectines de l'hôte. La sécrétion d'une la pectine méthyl estérase (PME) capable de déméthyliser la pectine, pourrait expliquer cette observation.

Un DE élevé serait donc capable de ralentir le processus de macération tissulaire, ce qui pourrait permettre au végétal infecté de mettre en place les moyens de sa défense.

Au niveau des tubercules, les résultats des marquages sont très disparates, ce qui rend les conclusions impossibles. Des études complémentaires s'avèrent donc nécessaires.

### III. RESUME, CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Nous avons au cours de notre travail, tenté de corréler le taux d'estérification des pectines à la sensibilité du végétal au macergène *Erwinia carotovora* pv *atroseptica* (Eca).

Nous avons d'abord montré que l'activité pectolytique de la PL secrétée par le macergène Eca diminue lorsque le degré de méthylation de son substrat augmente.

Ensuite, en utilisant deux cultivars de *Solanum tuberosum* de sensibilités différentes à Eca, nous avons vérifié l'action de la PL sur les pectines au sein des tissus via des mesures spectrophotométriques du surnageant d'incubation. Celles-ci nous montrent que la libération d'uronides insaturés (produits de la dégradation de la PL secrétée par Eca) est plus importante si l'enzyme est en contact avec les tissus caractérisés par une plus grande sensibilité à Eca. Bien que cette expérience prouve l'influence des pectines dans les phénomènes de sensibilité, nous avons montré que d'autres éléments semblent y participer également. En effet, le cultivar plus résistant se distingue par la synthèse de composés absorbant les longueurs d'onde de 200 à 400 nm, ceci indépendamment d'une attaque enzymatique des tissus. Un examen de la nature de ces composés et de leurs conditions de synthèse s'avèrerait particulièrement intéressant.

Nous avons alors étudié les caractéristiques de la pectine au sein des deux cultivars par marquage immunologique en microscopie électronique. Cette étude nous a permis de montrer que les tissus plus sensibles aux macergènes présentent un degré d'estérification (DE) moins élevé. Le taux d'estérification des pectines peut influencer la relation entre le végétal et un macergène, de plusieurs façons. D'une part, en modifiant l'affinité des enzymes pectiques pour leur substrat: un DE élevé diminue l'activité enzymatique de la PL comme de la PG. D'autre part, si le métabolisme d'Eca est assuré par les produits de dégradation des composés pectiques de son hôte, alors, une diminution de la libération de ces oligogalacturonides pourra favoriser la mise en place de mécanismes de résistance ou plus simplement retarder l'apparition des symptômes de la maladie.

Les marquages révèlent également que la quantité totale en pectine est plus élevée chez le cultivar résistant. Une telle propriété permet un maintien prolongé de la cohésion des parois du végétal malgré la dégradation enzymatique de ses constituants.

Enfin, nous avons observé l'effet pectolytique de la bactérie Eca sur les tissus infectés par cette même technique de marquage en microscopie électronique. Les résultats montrent que la pectine est dégradée au cours de l'infection par Eca, mais que de plus, son DE diminue au cours de l'infection. Eca semble donc capable de déméthyliser la pectine par la sécrétion d'enzymes spécialisées : les PME.

Nous pouvons donc conclure que les pectines présentes au sein des parois d'un végétal peuvent influencer par leur taux d'estérification la résistance au macergène, et cela au moins dans les premiers stades de l'infection.

Eca semble capable de déméthyliser les pectines par la sécrétion d'une enzyme spécialisée, la PME. Un DE élevé permettrait donc seulement de ralentir le développement du pathogène, le délai ainsi accordé pourrait permettre à la plante de mettre en place des mécanismes actifs de défense.

Nous avons observé au cours de l'infection la présence de la bactérie dans les parois, les zones de jonctions et les espaces intercellulaires. Les moyens que la bactérie utilise pour ainsi se déplacer au sein des tissus ne sont pas connus, mais ils posent la question de la rigidité-plasticité de la paroi.

Finalement, Eca est dotée de flagelles qui paraissent adsorber des composés pectiques. Nous n'avons retrouvé aucune indication à ce sujet dans la littérature. Seule une étude basée sur l'observation de l'effet d'une mutation de l'ADN codant pour les flagelles sur la virulence d'Eca pourra éclaircir cette observation.

La méthode que nous avons mis au point pour déterminer l'effet pectolytique de la PL d'Eca sur les tissus montre des perspectives intéressantes dans le cadre de la sélection de variants plus résistants de *Solanum tuberosum*. Par une simple mesure de l'évolution de l'absorbance à 235 nm des produits insaturés libérés par l'action de la PL sur les tissus tués par congélation, elle permet de distinguer rapidement (5 h environ) les végétaux présentant des parois moins sensibles à la dégradation enzymatique.

D'autre part, elle peut également mettre en évidence une synthèse par le végétal de composés absorbants dans l'UV proche susceptibles d'intervenir dans les mécanismes de défense (type phénolique), par l'utilisation de l'enzyme dénaturée placée en contact avec les tissus vivants.

Au vu de ces résultats, nous pouvons conclure que la sensibilité de *Solanum tuberosum* à la macération est partiellement liée à la quantité et au taux d'estérification de ses pectines pariétales.

TABLE DES MATIERES

**I. Introduction.....1**

1-Généralités : la pathologie végétale.....1

2-Les pathologies d'origine bactérienne.....2

3-Les relations hôte-pathogène.....2

4-Les bactéries, agents de la pourriture humide.....3

5-La paroi végétale : structure et composition.....5

    A/ Structure.....5

    B/ Composition.....6

        B.1 La phase microfibrillaire.....6

        B.2 La phase matricielle.....6

            B.2.1 Les hémicelluloses.....6

            B.2.2 Les pectines.....7

            B.2.3 Les protéines.....8

            B.2.4 Les lignines.....8

6-Dégradation de la paroi cellulaire.....9

7-La relation Solanum tuberosum - Eca.....11

    A/ Préliminaires.....11

    B/ La réponse de l'hôte à la présence d'Eca.....12

        B.1 Virulence du pathogène.....12

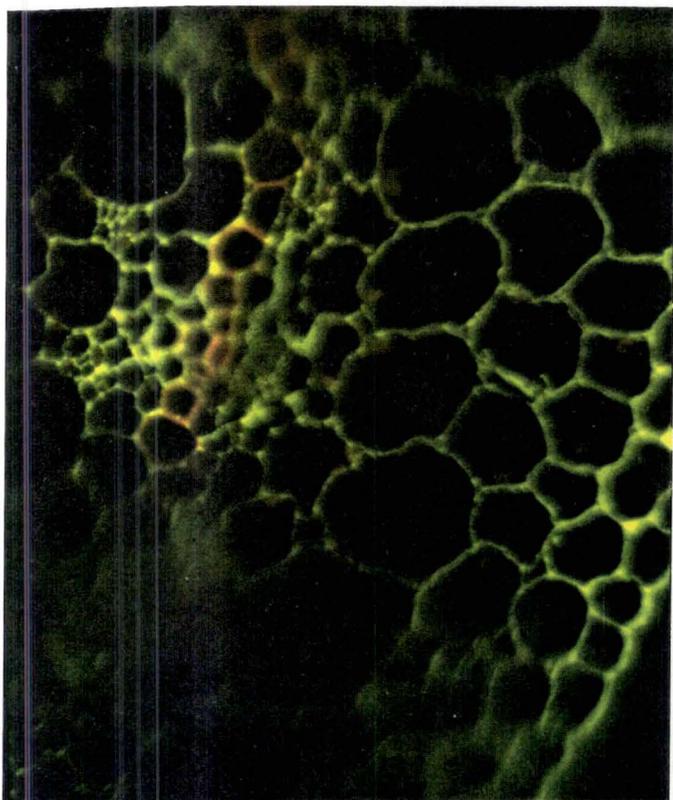
            Remarque : la régulation des enzymes  
                    pectiques.....12

        B.2 Mise en contact.....13

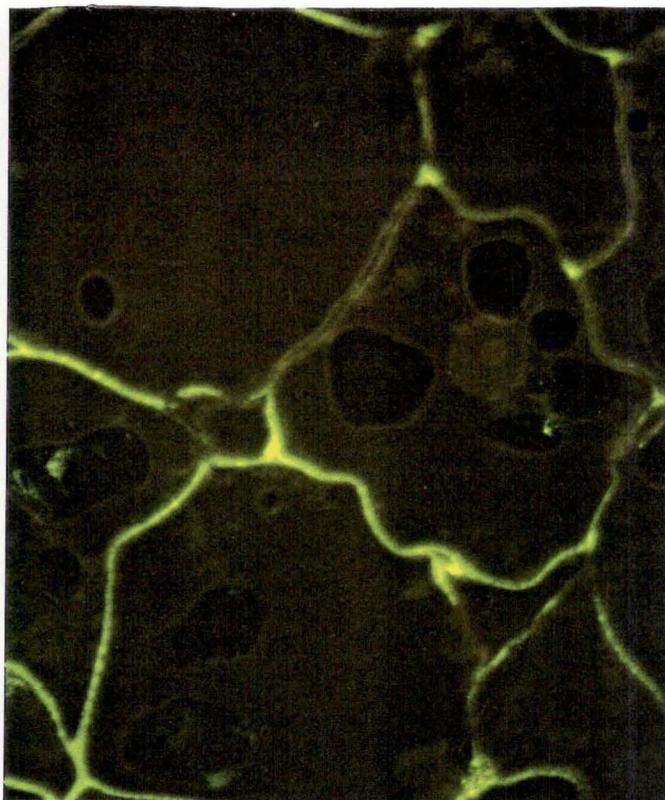
        B.3 La relation avec le macergène.....14

8-Objectif et démarche du travail.....18

Annexe 1: marquage en microscopie optique.

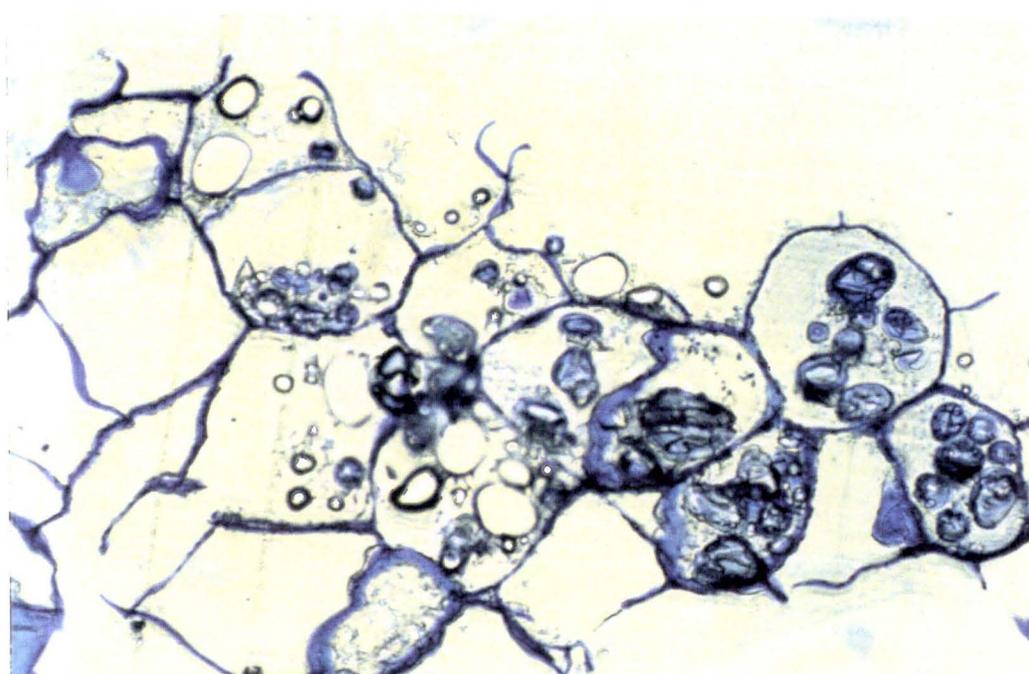


photographie 1 : Marquage en fluorescence (2F4/FITC) d'une tige (coupe transversale) de *Solanum tuberosum* var Charlotte; grossissement: 40 X



Photographie 2 : Marquage en fluorescence (2F4/FITC) d'un tubercule de *Solanum tuberosum* var Charlotte; grossissement : 40 X

Annexe 2 : coupe dans un tubercule fixé



Photographie 3 : Vue montrant la mauvaise inclusion des grains d'amidon dans la résine LR Withe; grossissement: 10 X

<b>II. Partie expérimentale.....</b>	<b>20</b>
<b><u>Chapitre 1</u> : Influence du DE sur l'activité de la PL.....</b>	<b>20</b>
1.A Matériel et méthode.....	20
1.A.1 Milieu de croissance et de conservation du pathogène.....	20
1.A.2 Production de la PL.....	21
1.A.3 Mesure de l'activité de la PL.....	21
1.B Résultats.....	22
1.C Résumé.....	23
<b><u>Chapitre 2</u> : Induction enzymatique de la macération       et de la mort cellulaire.....</b>	<b>24</b>
2.A Matériel et méthode.....	25
2.A.1 Matériel végétal.....	25
2.A.2 Production de la PL.....	25
2.A.3 Préparation du matériel végétal.....	25
2.A.4 Mesure de l'activité enzymatique.....	26
2.A.5 Mesure des variations d'absorbance et de conductivité.....	26
2.B Résultats.....	27
2.B.1 Activités enzymatiques des solutions.....	27
2.B.2 Mesures d'absorbance et de conductivité.....	29
a- Tiges.....	29
a-1 Evolution de l'absorbance.....	29
a-2 Evolution de la conductivité.....	31
b- Tubercules.....	32
b-1 Evolution de l'absorbance.....	32
b-2 Evolution de la conductivité.....	33
2.C Résumé.....	34

<u>Chapitre 3</u> : Evaluation du DE par marquage immunologique.....	36
Etape n°1 : Mise au point du protocole de fixation.....	37
3.1.A Matériel et méthode.....	37
3.1.A.1 Matériel végétal.....	37
3.1.A.2 Préparation des échantillons pour la microscopie.....	37
3.1.B Résultats.....	39
3.1.B.1 Tubercules.....	39
3.1.B.2 Tiges.....	39
3.1.C Résumé.....	39
Etape n°2 : Les marquages immunologiques.....	40
3.2.A Matériel et méthode.....	40
3.2.A.1 Matériel végétal.....	40
3.2.A.2 Préparation des échantillons pour la microscopie.....	40
3.2.A.3 Marquage.....	41
3.2.A.4 Déestérification.....	42
3.1.B Résultats.....	42
3.1.B.1 Mise au point du protocole de marquage.....	42
3.1.B.2 Marquage au ME au niveau des tiges.....	42
a- Marquage sans déestérification préalable.....	43
b- Marquage après déestérification.....	44
3.2.B.3 Marquage en ME au niveau des tubercules.....	50
3.2.B.4 Remarque générale.....	52
3.2.B.5 Résumé.....	54
<u>Chapitre 4</u> : Observation du DE sur les tissus infectés.....	55
4.A Matériel et méthode.....	55
4.A.1 Croissance du pathogène.....	55
4.A.2 Mode d'infection des microplantules.....	55
4.A.3 Mode d'infection des tubercules.....	56
4.A.4 Préparation des échantillons pour la ME.....	56
4.B Résultats.....	57

4.B.1 Infection au niveau des tiges.....	57
4.B.1.1 Cultivar Charlotte.....	58
4.B.1.1.a Vue générale des structures.....	58
4.B.1.1.b DE de la pectine au sein du tissu infecté.....	59
4.B.1.1.c Visualisation des parois par marquage.....	60
4.B.1.2 Cultivar Alpha.....	61
4.B.1.2.a Vue générale des structures.....	61
4.B.1.2.b DE de la pectine au sein du tissu infecté.....	62
4.B.2 Infection au niveau des tubercules.....	63
4.B.2.a Après 6h d'infection.....	64
4.B.2.b Après 12h d'infection.....	66
4.B.3 Remarque générale.....	67
4.B.4 Résumé.....	68
III. Résumé, conclusion et perspectives.....	69
Annexe.....	73
Table des matières.....	74

- Basham H. & Bateman D. F. (1975)  
Relationship of cell death in plant tissue treated with a homogeneous endopectate lyase to cell wall degradation  
Physiol. Plant Pathol., 5:249-262
- Bateman D. F. & Millar R. (1966)  
Pectic enzymes in tissue degradation  
Ann. Rev. Phytopathol., 4:119-146
- Bateman D. F. & Millar R. L. (1966)  
pectic enzymes in tissue degradation  
Ann. Rev. Phytopathol., 4:119-139
- Bateman D. F. (1968)  
The enzymatic maceration of plant tissue  
Neth. J. Pl. Path., 74:67-80
- Chatterjee A. K. & Starr M. P. (1977)  
Donor strains of the soft root bacterium *Ech* and conjugational transfer of the pectolytic capacity  
J. Bacteriol., 132: 862-69
- Chatterjee A. K., Thurn K. K. & Tyrell D. J. (1985)  
Isolation and characterization of Tn5 insertion mutants of *Ech* that are deficient in polygalacturonate catabolic enzymes  
J. Bacteriol., 162:708-714
- Collmer A. & Bateman D. F. (1982)  
Regulation of extracellular pectate lyase in *Ech*: evidence that reaction products of PL and exo-PG mediate induction on D-galacturonan  
Plant Pathol., 21:127-139
- Collmer A. & Keen N. (1986)  
The role of pectic enzymes in plant pathogenesis  
Ann. Rev. Phytopathol., 24:383-409
- Collmer A., Bateman P. & Mount M. S. (1981)  
Impaired reduction and self catabolite repression of extracellular pectate lyase in *Ech* mutants deficient in oligogalacturonide lyase  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78:3920-3924
- Collmer A., Berman P. & Mount M. S. (1982)  
Pectate lyase regulation and bacterial soft-rot pathogenesis  
Phytopathogenic Prokaryotes, Academic press, Vol 1:395-422
- Cother E. & Sivasithamparam K.  
Erwinia: the "Carotovora" group
- Davis K., Darvill A., Albersheim P. & Dell A. (1986)  
Host-pathogen interactions  
Plant Physiol., 80:568-577
- Farkas G. L. & Kiraly Z. (1962)  
Role of phenolic compounds in the physiology of plant diseases and disease resistance  
Phytopathologische Zeitschrift, 44:105-150
- Farmer E., Moloshok T., Saxton M. & Ryan C. (1990)  
Oligosaccharide signaling in plants  
The journal of biological chemistry Vol 266, No 5, 3140-3145

- Forrest R. & Lyon G. (1990)  
Substrate degradation patterns of PL from *E. car.* and *Bacillus polymyxa*  
and phytoalexin eliciting oligosaccharides from potato cell walls  
*Journal of Experimental Botany*, Vol 41, No 225, 1-8
- Fox R., Manners J. & Myers A. (1972)  
Ultrastructure of tissue desintegration and host reactions in potato  
tubers infected by *Eca*  
*Potato Res.*, 15:130-154
- Garibaldi A. & Bateman D. F. (1971)  
Pectic enzymes produced by *Ech* and their effects on plant tissue  
*Physiol. Plant Pathol.*, 1:25-40
- George H. L., Mount M. S. & Berman P. M. (1991)  
Cellular localization and characterization of pectic enzymes of *Eca*  
*Phytopathol.*, Vol 81, No 2:134-139
- Graham J. S., Hall G., Pearce G. & Ryan C. A. (1986)  
Regulation of synthesis of proteinase inhibitors I & II mRNAs in leaves  
of wounded tomato plants  
*Planta*, 169:399-405
- Graham J. S., Pearce G., Merryweather J., Titany K., Ericson L. H. & Ryan C. A.  
Wound induced proteinase inhibitors from tomato leaves. The cDNA deduced  
primary structure of pre-inhibitor I  
*Journal of Biological Chemistry*, 260:6555-6564
- Heide-Jorgensen H.S. (1990)  
Cuticle development and ultrastructure: evidence for a procuticle of  
high osmium affinity  
*Planta*, 183:511-519
- Hsu S. T., Huang H. C. (1987)  
Chemotaxis of *Eca* and *Ech*  
*Proceedings of the National Science Council, B (Life Science), Taiwan*, 11:80-89
- Jarvis et al, 1984  
Structure and properties of pectin gels in plant cell walls  
*Plant, cell and environment*, 7:153-164
- Keen N. T., Dalhbeck D., Staskawiez B. and Belser W. (1984)  
Molecular cloning of pectate lyase genes from *Ech* and their expression  
in *E. coli*  
*J. Bacteriol.*, 159:825-31
- Knox J., Linstead P., King J., Cooper C. & Roberts K. (1990)  
Pectin esterification is spatially regulated both within cell walls and  
between developing tissues of root apices  
*Planta*, 181:512-521
- Kotoujansky A. (1987)  
Molecular genetics of pathogenesis by soft-rot *Erwinias*  
*Ann. Rev. Phytopathol.*, 25:405-430
- Kuc J. (1973)  
Metabolites accumulating in potato tubers following infection and stress  
*Teratology*, 8:333-338

- Lamb C., Lawton M., Dron M. & Dixon A. (1989)  
Signals and transduction mechanisms for activation of plant defenses  
against microbial attack - a review  
Cell, 56:215-224
- Lee J. S., Brown W. E., Graham J. S., Pearce G., Fox E. A. & Ryan C. A. (1981)  
Molecular characterisation and phylogenetics studies of a wound  
inductible proteinase inhibitor I gene in Lycopersicon species  
Physiol. Plant Pathol., 23:377-385
- Lovrekovitch L., Lovrekovitch H. & Stahman M. A. (1967)  
Inhibition of phenol oxidation by *Erwinia carotovora* in potato tuber  
tissue and its significance in disease resistance  
Phytopathol., 57:737-742
- Lyon G. D., Lyon G. D. & Robertson W. (1989)  
Observations on the structural modification of Eca in rotted potato tuber  
tissue  
Physiological and Molecular Plant Pathology 34, 181-187
- Lyon G. D. & Baylis C. E. (1975)  
The effect of rishitin on *Erwinia carotovora* var *atroseptica* and other  
bacteria  
Physiol. Plant Pathol., 6:177-186
- Lyon G. D. & McGill F. M. (1988)  
Inhibition of growth of *Erwinia carotovora* in vitro by phenolics  
Potato research, 31:461-467
- Lyon G. D. (1989)  
The biochemical basis of resistance of potatoes to soft rot *Erwinia* spp.  
- a review  
Plant pathol., 38:313-339
- Maher E. A. & Kelman A. (1983)  
Oxygen status of potato tuber tissue and its relation to maceration by  
pectic enzymes of *Erwinia carotovora*  
Phytopathol., 73:536-539
- Mc Neil M., Darvill A. G., Fry S. C. & Albersheim P. (1984)  
Structure and function of the primary cell walls of plants  
Ann. Rev. Biochem., 53:625-633
- McGuire R. & Kelman A. (1984)  
Reduced severity of *Erwinia* soft rot in potato tubers with increased  
calcium content  
Phytopathol., 74:1250-1256
- McGuire R. & Kelman A. (1985)  
Calcium in potato tuber cell walls in relation to tissue maceration by  
Eca  
Phytopathol., 76:401-406
- McNeil M., Darvill A. G., Fry S. C., Albersheim P. (1984)  
Structure and function of the primary cell wall of plants  
Ann. Rev. Bio. Biochem., 53:625-663
- Moran F. & Starr M.P. (1969)  
Metabolic regulation of polygalacturonic acid trans eliminase in *Erwinia*  
Eur. J. Biochem., 11:291-295

- Mount M., Bateman D. & Grant Basham H. (1969)  
Induction of electrolyte loss, tissue maceration, and cellular death of potato tissue by an endopolygalacturonate trans-eliminase  
Phytopathol., 60:924-931
- Nasuno S. & Starr M. (1966)  
Polygalacturonase of E car.  
The journal of biogenical chemistry Vol 241, No 22, 5298-5306
- Neff N., Binns A. & Brandt C. (1986)  
Inhibitory effects of a pectin-enriched tomato cell wall fraction on Agrobacterium tumefaciens and tumor formation  
Plant Physiol., 83:525-528
- Paquel W. & Heitefuss R. (1989)  
Calcium content and cell wall polygalacturonans in potato tubers of cultivars with different susceptibilities to Eca  
Physiological and Molecular Plant Pathology, 35:11-21
- Paquel W. & Heitefuss R. (1990)  
Enzymes activities in soft rot pathogenesis of potato tubers:effect of calcium, pH, and degree of pectin esterification on the activities of PG  
Physiological and Molecular Plant Pathology, 37:9-25
- Quantick P., Cervone F. & Wood R. (1983)  
Isoenzymes of a polygalacturonate trans-eliminase produced by Eca in potato tissue and in liquid culture  
Physiological Plant Pathology, 22:77-86
- Raikhel N., Mishkind M. & Palevitz B. (1984)  
Immunocytochemistry in plants with colloidal gold conjugates  
Protoplasma, 121:25-33
- Ried J. & Collmer A. (1986)  
Comparison of pectic enzymes produced by Ech, Ecc, and Eca  
Applied and environmental microbiology Vol 52, No 2, 305-310
- Robertson N. F., Friend J., Aveyard M., Brown J., Huffee M. & Homans A. L. (1968)  
The accumulation of phenolic acids in tissue culture pathogen combinations of Solanum tuberosum and Phytophthora infestans  
Journal of General Microbiology, 54:261-268
- Scheel D. & Parker J. (1990)  
Elicitor recognition and signal transduction in plant defense gene activation  
Z. Naturforsch., 45C:569-575
- Selvendran R. R. (1985)  
Developments
- Semal J. et al  
Traité de pathologie végétale  
Presse agronomique de Gembloux, 143-168; 249-302
- Sequeira L., Gaard G. & De Zoeten A. (1977)  
Interaction of bacteria and host cell walls:its relation to mechanisms of induced resistance  
Physiol. Plant Pathol., 10:43-50
- Stack J., Mount M., Berman P. & Hubbard J. (1979)  
Pectic enzyme complex from Erwinia caratovora:a model for degradation and assimilation of host pectic fractions  
Phytopathol., 70:267-272

- Templeton M. & Lamb C. J. (1988)  
Elicitors and defence gene activation  
Plant, Cell and Environment, 11:395-401
- Tort M., Gendraud M. & Courduroux JC. (1985)  
Mechanisms of storage in dormant tubers: correlative aspect, biochemical  
and ultrastructural approaches  
Physiol. Vég., 23(3):289-299
- Tseng T. & Mount M. (1973)  
Toxicity of endopolygalacturonate trans-eliminase, phosphatidase and  
protease to potato and cucumber tissue  
Phytopathol., 64:229-236
- Vogt G. & Coulomb J. (1984)  
Pénétration d'une endo-pectate lyase tritiée dans les cellules  
corticales de racines de courges  
Can. J. Bot., 62:1621-1628
- Vreeland V., Morse S., Robichaux R., Miller K., Hua S. & Laetsch W. (1989)  
Pectate distribution and esterification in *Dudautia* leaves and soybean  
nodules, studied with a fluorescent hybridization probe  
Planta, 177:435-446
- Weber J. (1983)  
The role of pectin on the significance of varietal and seasonal  
differences in soft rot susceptibility of potato tubers  
Phytopath. Z., 108:135-142
- Zook M. N., Rush J. S. & Kuc J. A. (1987)  
A role for calcium in the elicitation of rishitin and lubimin  
accumulation in potato tuber tissue  
Plant Physiol., 84:520-525