

## LA PAROI DES CONIDIES DE *COLLETOTRICHUM LAGENARIUM* (PASS.) ELL. ET HALST

M. T. ESQUERRÉ-TUGAYÉ et A. TOUZÉ

Centre de Physiologie Végétale, Faculté des Sciences, 31, Toulouse, France

(Received 10 March 1970, in revised form 28 May 1970)

**Résumé**—Les parois des conidies de ce champignon Deutéromycète ont été isolées mécaniquement, purifiées puis analysées après fractionnement. D'après des critères biochimiques, ces organites renferment des polysaccharides contenant une forte proportion de rhamnose, des hemicelluloses (vraisemblablement galactoglucomannanes), de la chitine, une partie cellulosique, ainsi que des protéines riches en proline; il n'a pas été détecté de polyuronides et de pentosanes.

**Abstract**—The cell walls from these Deuteromycete fungal conidia were mechanically separated, cleaned, then divided into fractions and analysed. According to biochemical data, they include polysaccharides with a high level of rhamnose, hemicelluloses (probably galactoglucomannans), chitin, a cellulosic fraction and also proline rich proteins; polyuronides and pentosans have not been identified.

### INTRODUCTION

Nous précisons ci-après la composition chimique des parois des conidies de *Colletotrichum lagenarium*. L'association de ce champignon Deutéromycète avec une Cucurbitacée (*Cucumis melo*), nous sert actuellement de modèle pour étudier les relations entre un parasite trophique et son hôte.

Deux objectifs ont motivé la réalisation du présent travail: une meilleure connaissance de l'agent pathogène dans la forme sous laquelle il gagne l'hôte lors de la phase pré-infectieuse. Les résultats exposés s'ajoutent à ceux précédemment publiés par l'un de nous,<sup>1</sup> sur les constituants protoplasmiques de la même cellule/et la mise au point d'une méthodologie appropriée en vue de rechercher le rôle éventuel de la paroi dans le mécanisme pathogénique. En effet, d'après les travaux de Akai et Ishida,<sup>2,3</sup> en microscopie électronique, cet organite pourrait participer activement à la différenciation des structures d'infection (tube germinatif et appressorium) qui suit la germination de la spore et précède la pénétration dans les cellules hôtes.

### RESULTATS

#### *Isolation, Purification, Fractionnement des Parois*

Les parois ont été isolées en milieu aqueux à +2°, selon le protocole décrit par Owens et al.,<sup>4</sup> à partir de spores lyophilisées, puis broyées (à sec, broyeur à billes métalliques) et délipidées (à froid par l'éther de pétrole et l'éther sulfurique).

La préparation ainsi obtenue apparaît fortement contaminée par des constituants cytoplasmiques puisqu'elle renferme notamment près de 40 pour cent de protéines. Après avoir

<sup>1</sup> M. T. ESQUERRÉ-TUGAYÉ, *C.R. Acad. Sci., Paris*, **269**, 1254 (1969).

<sup>2</sup> S. AKAI et N. ISHIDA, *Mycopathol. Mycol. Appl.* **34**, 337 (1968).

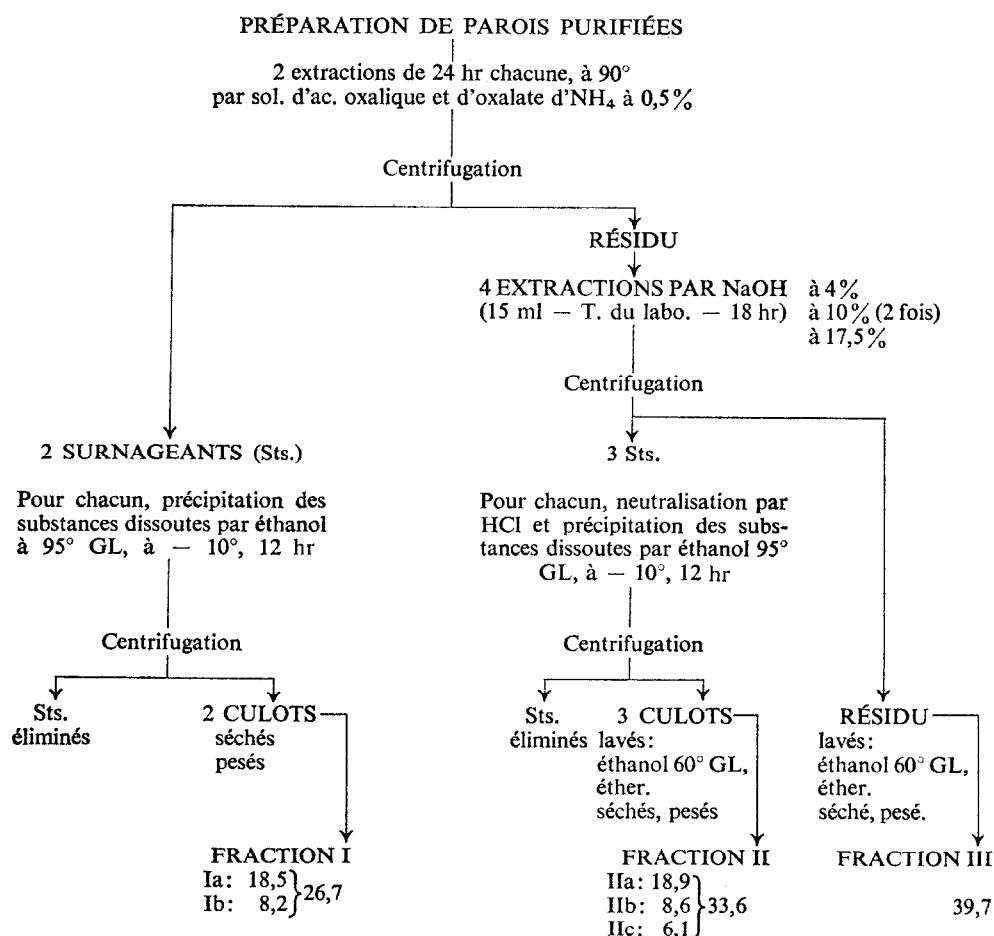
<sup>3</sup> N. ISHIDA et S. AKAI, *Mycopathol. Mycol. Appl.* **35**, 68 (1968).

<sup>4</sup> R. G. OWENS, H. M. NOVOTNY et M. MICHELS, *Cont. Boyce Thompson Inst.*, **19**, 355 (1958).

testé divers traitements, nous avons effectué une déprotéinisation de ces parois 'brutes' par le solvant phénol-acide acétique-eau (pds, v/v),<sup>5</sup> à 0°, avec agitation magnétique, en présence de billes de verre, durant 3 hr. On centrifuge ensuite (18.000 g, 30 min), on lave abondamment à l'éther sulfurique et on sèche sous vide en présence de chlorure de calcium. La quantité de protéines ainsi solubilisées avoisine 20 pour cent.

Le Tableau 1 résume les diverses étapes du fractionnement conduit alors sur cette préparation partiellement purifiée.

TABLEAU 1. CONDUITE DU FRACTIONNEMENT ET IMPORTANCE RELATIVE DES FRACTIONS (EN mg POUR 100 mg DE PAROIS)



### Composition des Fractions

Pour chaque fraction, l'étude de la partie glucidique a consisté essentiellement en une analyse des oses neutres et des oses aminés, car nous n'avons, en aucun cas, caractérisé d'acides uroniques; nous avons dosé en outre les protéines.

Le Tableau 2 indique les résultats relatifs aux oses neutres après hydrolyse des fractions

<sup>5</sup> E. W. THOMPSON et R. D. PRESTON, *Nature* 5077, 684 (1967).

par l'acide sulfurique qui s'est avéré, lors d'essais préliminaires, conduire aux meilleurs rendements. Nous avons adjoint les données acquises après une hydrolyse par l'acide trifluoroacétique, effectuée sur la préparation de parois purifiées, sans fractionnement préalable.

TABLEAU 2. RENDEMENTS EN OSSES NEUTRES DANS DIFFÉRENTES CONDITIONS D'HYDROLYSE (mg POUR 100 mg DE PAROIS)

Oses	Fractions: hydrolyse sulfurique						Parois: hyd. TFA	
	I		II			III		
	a	b	a	b	c			
Rhamnose	3,3	1,4	0,5	0,1	+		5,3	7,5
Ribose	0,2	+	0,2	+	+		0,4	0,9
Mannose	1,7	1,0	0,7	0,2	+	2,4	6,0	7,4
Arabinose			+	+	+		+	0,6
Galactose	1,2	0,3	0,7	0,1	0,5	0,6	3,4	7,7
Xylose			+			+		
Glucose	1,1	0,9	1,9	0,9	+	11,4	16,2	10,4
Totaux	7,5	3,6	4,0	1,3	0,5	14,4	31,3	34,5

TFA, ac. trifluoroacétique. +, Quantité faible. Oses présentés dans l'ordre de leur élution.  
 $\Sigma$ , Rendement total en chaque ose.

Afin de comparer les diverses fractions entre elles, leur composition, en pourcentages, est présentée dans le Tableau 3; celui ci permet encore de faire apparaître certaines relations entre leurs caractères de solubilité et leur nature chimique.

TABLEAU 3. COMPARAISON DES FRACTIONS (EN %)

Composé	Fractions					
	I		II			III
	a	b	a	b	c	
Oses neutres						
Rhamnose	18,0	17,1	2,9	0,6	0,6	
Ribose	0,9	0,2	0,8		0,6	
Mannose	9,4	12,2	3,6	1,7	0,5	6,0
Arabinose		0,1	0,3	0,1		
Galactose	6,5	3,7	3,9	1,1	7,8	1,5
Xylose		0,1				
Glucose	5,7	11,0	10,0	10,5	0,8	28,8
$\Sigma$	40,5	44,4	21,4	14,2	10,4	36,3
Ose aminé						
Glucosamine			1,2	3,0	8,6	26,7
Protéines	59,2	30,7	18,4	11,2	35,5	4,1
Total des composés identifiés	99,7	75,1	41,0	28,4	54,5	67,1

$\Sigma$ : Somme des oses neutres.

## DISCUSSION

Dans les parois des conidies de *Colletotrichum lagenarium* nous avons caractérisé 8 monomères glucidiques: 1 ose aminé, la glucosamine; 3 pentoses, présents en quantités très faibles, arabinose, xylose et ribose; 3 hexoses, glucose, galactose et mannose; 1 désoxyose, le rhamnose; l'abondance de ce composé, mérite d'être notée car il n'a été que rarement signalé dans les parois fongiques.<sup>6</sup> Pour la caractérisation et l'estimation des oses neutres soulignons l'intérêt de l'hydrolyse par l'acide trifluoroacétique préconisée par Albersheim. En effet, nous constatons que cette méthode, appliquée sur des parois entières et sans fractionnement préalable, libère des quantités d'oses au moins égales à celles obtenues après hydrolyse sulfurique des diverses fractions sauf en ce qui concerne le glucose; nous discuterons ultérieurement ce fait.

Les acides uroniques (ou des dérivés) n'ont pu être décelés en utilisant diverses techniques couramment employées dans ce but; il est vrai que ces composés n'ont été que rarement mis en évidence chez les champignons et toujours en faibles proportions.<sup>7</sup>

D'après les caractères de solubilité des fractions et la nature des monomères détectés par hydrolyse on peut avancer des hypothèses sur les types de polymères glucidiques des parois de ces spores.

Les constituants des fractions Ia et b présentent des analogies avec les substances pectiques:<sup>8</sup> solubilité dans les solutions diluées d'acides faibles (ac. oxalique-oxalate d'ammonium) et teneurs importantes en rhamnose et galactose. Cependant, on ne peut les classer dans ce groupe puisque celui-ci, d'après les règles de mononclature,<sup>9</sup> doit renfermer des composés à forte proportion d'unités acide galacturonique. Nous n'avons pas précisé si le ribose décelé dans cette fraction entre dans la composition des polyosides, s'il provient d'acides ribonucléiques des parois ou d'ARN cytoplasmiques contaminants.

Les polyosides solubles dans les solutions de bases fortes (soude à 4, 10 et 17,5 pour cent) libèrent essentiellement, après hydrolyse sulfurique, du glucose, du mannose et du galactose; ces oses neutres sont obtenus en proportions relatives variables suivant les sous-fractions IIa, b et c. On peut supposer qu'il s'agit d'hemicelluloses et probablement de galactoglucosmannanes. En outre, de la glucosamine est aussi caractérisée dans les trois cas; il y a de fortes présomptions pour qu'elle existe là sous une forme distincte de la chitine. Par comparaison avec ce qui a été trouvé dans les parois de Levure de boulangerie,<sup>10</sup> il est possible que cet ose aminé intervienne dans les liaisons entre polyosides et protéines; nous procérons actuellement à l'isolement de glycoprotéines à partir de ces parois conidiennes.

Dans la fraction résiduelle III on trouve un ose aminé, la glucosamine. On constate qu'elle représente 27 pour cent environ de cette fraction (en appliquant aux résultats du dosage la correction qui s'impose après cette hydrolyse drastique); elle provient vraisemblablement de la chitine (ou de chitosane) car ce polymère, présent dans la majorité des champignons, est insoluble dans les mélanges solvants utilisés pour le fractionnement. Il apparaît ensuite que, parmi les oses neutres libérés à partir de cette fraction III, le glucose (80 pour cent) prédomine très largement sur le mannose (16 pour cent) et le galactose (4 pour cent). Nous

<sup>6</sup> J. M. ARONSON, in *The Fungi* (edited by G. C. AINSWORTH et A. S. SUSSMAN), Vol. 1, p. 67, Academic Press, New York (1965).

<sup>7</sup> J. M. GANCEDO, G. GANCEDO et. G. ASENSIO, *Biochem. Z.* **346**, 328 (1966).

<sup>8</sup> D. H. NORTHCOTE, in *International Review of Cytology* (edited by G. H. BOURNE et J. F. DANIELLI), Vol. 14, p. 224, Academic Press, New York (1963).

<sup>9</sup> R. I. WHISTLER et C. L. SMART, in *Polysaccharide Chemistry*, p. 162, Academic Press, New York (1953).

<sup>10</sup> E. D. KORN et D. H. NORTHCOTE, *Biochem. J.* **75**, 12 (1960).

avons déduit de ces résultats qu'il existait des glucanes et nous avons tenté de préciser leur nature d'après différents critères biochimiques

Du point de vue de la solubilité, ces composés s'avèrent insolubles dans les solutions d'acides faibles et de bases fortes, solubles dans le réactif de Schweitzer et reprécipitables par acidification. Leur hydrolyse chimique, par l'acide sulfurique, libère une quantité de glucose (29 pour cent) plus élevée que celle (17 pour cent) par l'acide trifluoroacétique. Ceci laisse supposer la présence de liaisons osidiques 1-4 qui ne sont que partiellement rompues dans les conditions d'hydrolyse trifluoroacétique employées.<sup>11</sup>

Enfin, le traitement par une cellulase effectué simultanément sur la fraction III et sur de la cellulose témoin conduit à un produit qui, en chromatographie sur papier, se comporte comme du cellobiose; on décèle en outre un peu de glucose, ce qui indique la présence de cellobiase dans la préparation de cellulase utilisée.

L'ensemble des données que nous venons d'énumérer nous permet de penser que le glucose de la fraction III provient, pour une bonne part, de cellulose ( $\beta$  1,4 glucane) qui serait présente en même temps que la chitine. Il s'agirait donc là d'un cas particulier chez les Septomycètes qui, d'après Bartnicki-Garcia,<sup>12</sup> renferment plutôt des  $\beta$  1,3 et  $\beta$  1,6 glucanes associés à la chitine.

Enfin, nous avons dosé des protéines dans toutes les fractions (13,5 mg dans Ia, b—6,7 mg dans IIa b, c—1,6 mg dans III, en partant de 100 mg de parois). Il est probable qu'elles n'appartiennent pas exclusivement aux parois et que toutes les protéines provenant du contenu cellulaire n'ont pas été solubilisées lors de la déprotéinisation. L'hydrolyse chlorhydrique<sup>13</sup> de ces macromolécules libère les acides aminés courants; l'hydroxyproline n'est pas décelable mais la proline est un des monomères prédominants.

En conclusion, les divers polymères analysés se répartissent de la façon suivante (en mg pour 100 mg de préparation de parois): polyosides solubles dans les sol. d'ac. faible, 11,1; hemicelluloses, 6,9; chitine, 12,5; partie cellulosique, 14,4; protéines, 21,8.

## METHODES EXPERIMENTALES

### Obtention du Matériel Biologique

Les modalités de culture du champignon et de récolte des conidies ont été décrites précédemment.<sup>14</sup>

### Etude des Oses Neutres

L'hydrolyse des fractions de parois par l'acide sulfurique est conduite comme l'indiquent Horikoshi *et al.*<sup>15</sup> Les hydrolysats sont neutralisés par une solution saturée de  $\text{Ba}(\text{OH})_2$  puis filtrés. Les filtrats sont débarrassés des ions restants par passage sur colonnes de résines anionique et cationique, puis évaporés à sec.

L'hydrolyse des parois par l'acide trifluoroacétique est effectuée dans les conditions préconisées par Albersheim.<sup>16</sup> La portion soluble recueillie est évaporée à sec sous vide (+30°), après plusieurs lavages.

Dans les deux cas, les résidus sont repris par une solution d'acide borique 0,1 M portée à pH 8,0 (N NaOH); une partie aliquote de la solution est fixée sur une colonne de résine anionique (chromobeads, type S, forme  $\text{BO}_3^{3-}$ ). Le séparation, l'identification et le dosage des différents oses sont réalisés avec un 'Auto-Analyzer Technicon'.<sup>17</sup> La Figure 1 présente deux reproductions d'élutogrammes obtenus avec ce protocole, l'une montrant la séparation des différents oses caractérisés dans les parois, l'autre faisant apparaître les produits de l'hydrolyse sulfurique de la fraction I. Dans les conditions retenues le fucose, méthylpentose parfois présent dans les parois n'est pas éluté. L'identification du rhamnose a été confirmée après séparation (chromatographie préparative sur papier whatman 1, dans le système solvant pyridine:2-acétate

<sup>11</sup> J. M. McNAB, D. J. NEVINS et P. ALBERSHEIM, *Phytopathol.* **57**, 625 (1967).

<sup>12</sup> S. BARTNICKI-GARCIA, *Phytopathol.* **59**, 1065 (1969).

<sup>13</sup> P. BOULANGER et G. BISERTE, *C.R. Ann. Biochim. Med.* **11**, 53 (1950).

<sup>14</sup> M. T. TUGAYÉ et A. TOUZÉ, *C.R. Acad. Sci., Paris*, **264**, 2292 (1967).

<sup>15</sup> K. HORIKOSHI et S. IIDA, *Biochim. Biophys. Acta*, **83**, 197 (1964).

<sup>16</sup> P. ALBERSHEIM, *Carbohyd. Res.* **5**, 340, (1967).

<sup>17</sup> P. AURIOL et A. TOUZÉ, *Physiol. Végétale* **8**, 263 (1970).

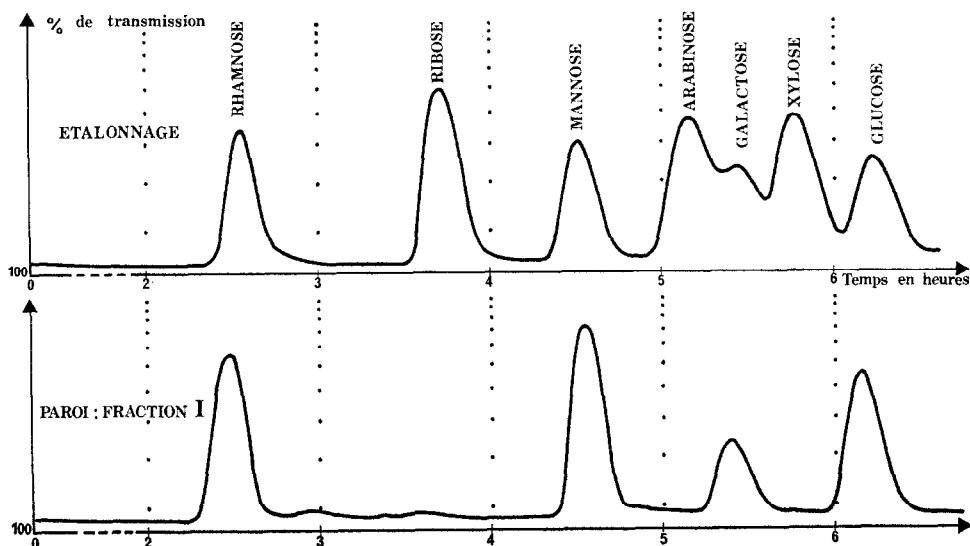


FIG. 1. IDENTIFICATION DES OSSES DE LA FRACTION I.

d'éthyle:8—eau:1; équilibration:14 hr, migration:30 hr;  $R_g = 4,32$ ), puis élution et réaction à l'acide thioglycolique en milieu sulfurique.<sup>18</sup>

#### Analyse des Oses Aminés

Les fractions sont soumises à une hydrolyse par HCl selon Jaworski et Wang;<sup>19</sup> HCl est éliminé, sous vide, en présence de NaOH en pastilles. Le degré de dégradation des oses aminés dans ces conditions (25 pour cent) est apprécié à partir de chitine témoin (Eastman org. chem.) purifiée. La mise en évidence de ces composés est faite par chromatographie sur papier après oxydation, par la ninhydrine,<sup>20</sup> en pentoses correspondants<sup>21</sup> et révélation par le réactif au chlorure de triphényl tétrazolium.<sup>22</sup> Leur dosage est réalisé par la méthode à l'anhydride acétique.<sup>23</sup>

#### Recherche des Acides Uroniques

Plusieurs types d'hydrolyse ont été appliqués: HCOOH à 90 %, en tubes scellés à 100°, 15 hr; HCl 0,45 N, en tubes scellés à 100°, 12 hr et HNO<sub>3</sub> à 3 %, à 100°, 12 hr. Après élimination des acides par évaporation répétées (HCOOH, HCl) ou passage sur résine (HNO<sub>3</sub>) le matériel solubilisé est chromatographié dans deux systèmes solvants différents: pyridine, acétate d'éthyle, H<sub>2</sub>O (2, 8, 1) 30 hr; et pyridine, acétate d'éthyle, acide acétique, H<sub>2</sub>O (5, 5, 1, 3) 48 hr. AgNO<sub>3</sub> en solution aqueuse saturée est utilisé pour la révélation.

#### Dosage des Protéines

Les fractions sont traitées par NaOH 0,5 N, à 100°, pendant 20 min. Les protéines solubilisées sont dosées par la méthode de Lowry *et al.*<sup>24</sup> La courbe de référence est établie avec de l'albumine de sérum de boeuf (NBC).

<sup>18</sup> M. GIBBONS, *Analyst* **80**, 268, (1955).

<sup>19</sup> E. G. JAWORSKI et L. C. WANG, *Phytopathol.* **55**, 401, (1965).

<sup>20</sup> S. GARDELL, F. HEIJKENS KJOLD et A. ROCH-NORLUND, *Acta Chem. Scand.* **4**, 970 (1950).

<sup>21</sup> P. J. STOFFYN et R. W. JEANLOZ, *Arch. Biochem. Biophys.* **52**, 373 (1954).

<sup>22</sup> L. SZABADOS, G. VASS et L. MESTER, *C. R. Acad. Sci., Paris*, **266**, 291 (1968).

<sup>23</sup> S. ROSEMAN et I. DAFFNER, *Anal. Chem.* **28**, 1743 (1956).

<sup>24</sup> D. H. LOWRY, N. J. ROSEBROUGH, A. L. FARR et R. J. RANDALL, *J. Biol. Chem.* **193**, 265 (1951).

*Enzymolysse de la Fraction III*

25 mg de fraction III (ou de cellulose témoin, Sigma) sont mis en suspension dans 2 ml de tampon citrate-phosphate<sup>25</sup> de pH 5,4 contenant 0,2 mg de cellulase (NBC); une goutte de toluène est ajoutée. Après 4 et 8 hr à 40°, la réaction est arrêtée en inactivant l'enzyme par la chaleur. Le résidu insoluble est éliminé par centrifugation et les produits de l'hydrolyse analysés en chromatographie sur papier (solvant: n-BuOH, acétone, eau, 4, 5, 1—24 hr—révélation au phthalate acide d'aniline) et en chromatographie sur colonne (Auto-Analyzer Technicon).

*Remerciements*—Nous remercions Madame P. Sanchez pour son assistance technique compétente.

<sup>25</sup> G. GOMORI, in *Methods in Enzymology* (edited by S. P. COLOWICK et N. O. KAPLAN), Vol. 1, p. 141, Academic Press, New York (1955).