

BULLETIN MENSUEL  
DE LA  
**SOCIÉTÉ LINNÉENNE DE LYON**

FONDÉE EN 1822

RECONNUE D'UTILITÉ PUBLIQUE PAR DÉCRET DU 9 AOÛT 1937  
des SOCIÉTÉS BOTANIQUES DE LYON, D'ANTHROPOLOGIE ET DE BIOLOGIE DE LYON  
REUNIES  
et de leurs GROUPES RÉGIONAUX : ROANNE, VALENCE, etc.

**Siège social et Secrétariat général : 33, rue Bossuet, 69006 Lyon**

**TRESORERIE :**

## T A R I F 1 9 7 6

Abonnement France .....	45 F
Membre scolaire .....	22 F
Abonnement Etranger .....	50 F
Changement d'adresse, inscription ou réintégration en sus .....	7 F

N.B. — Les virements à notre C.C.P. **LYON 101-98** ou les chèques bancaires, doivent être rédigés au nom de la SOCIÉTÉ LINNÉENNE DE LYON.

**SOMMAIRE**

ROMAN E. et PICHOT J. — Diptères <i>Culicidae</i> de la faune Lyonnaise : Moustiques nouveaux, renseignements complémentaires sur certains déjà signalés .....	57
RAYNAUD P. — Synopsis morphologique des larves de <i>Carabus</i> Lin. (Coléoptères <i>Carabidae</i> ) connues à ce jour .....	61
EGHBALTALAB M., DEBAUD J.-C. et BRUCHET G. — Etude in vitro des activités pectinolytique et cellulolytique de <i>Fomes annosus</i> (Fr.) Cke et de <i>Rosellinia quercina</i> Hart .....	85
FAURE-RAYNAUD M. et GOURBIÈRE G. — Microflore des aiguilles de sapin <i>Abies alba</i> Mill. : Bactéries et levures .....	90

**PARTIE ADMINISTRATIVE****RAPPORT MORAL POUR L'ANNEE 1975**

Chers Collègues,

Conformément à nos statuts votre Président doit vous donner un compte rendu moral pour l'année qui se termine.

Ce résumé de notre activité va permettre aux 107 membres nouveaux de mieux se rendre compte des ressources de leur association.

A fin 1974 notre effectif était de 1559 membres, il est de 1478 à ce jour. Cette tendance déjà notée par nos prédécesseurs peut s'expliquer en partie par la mise en ordre de notre fichier.

Il serait intéressant de savoir si ces radiations correspondent à des lecteurs lointains ou s'il se dégage une forte proportion de résidents de notre région ?

## ETUDE IN VITRO DES ACTIVITES PECTINOLYTIQUE ET CELLULOLYTIQUE DE FOMES ANNOSUS (FR.) CKE ET DE ROSELLINIA QUERCINA HART.

par M. EGHBAL TALAB, J.-C. DEBAUD et G. BRUCHET.

Afin de mieux comprendre les mécanismes qui président à l'établissement de l'infection des racines d'arbres par *F. annosus* et *R. quercina* et de préciser plus particulièrement les aspects enzymatiques de la pénétration de ces pathogènes, nous avons entrepris l'étude in vitro des activités cellulolytique et pectinolytique de ces champignons.

### 1. — MATÉRIEL ET MÉTHODES.

#### 1 - 1. — Culture des mycéliums.

Les cultures sont effectuées à  $18^{\circ} \pm 1^{\circ} \text{C}$  à partir d'inoculum obtenus sur milieu de Hagem. Elles sont réalisées en milieu liquide<sup>1</sup> contenant soit de la cellulose<sup>2</sup>, soit de la pectine<sup>3</sup> comme seule source de carbone.

#### 1 - 2. — Obtention des filtrats de cultures.

Après centrifugation des cultures les différentes activités enzymatiques sont recherchées dans le surnageant. Le culot mycélien est récupéré pour le dosage des protéines.

#### 1 - 3. — Mesure des activités cellulolytique et pectinolytique par viscosimétrie.

Les enzymes pectinolytiques et cellulolytiques scindant les macromolécules des composés pectiques et des dérivés solubles de la cellulose (hydroxyéthyl et carboxyméthyl-cellulose) provoquent une diminution de leur viscosité.

L'emploi de dérivés solubles tels que l'hydroxyéthylcellulose ne permet pas de préciser les premières étapes de dégradation modifiant la cellulose native. Il fournit par contre une bonne indication de l'action des cellulases (Cx) sur cette cellulose modifiée (REESE et LEVINSON, 1952).

Les mesures sont effectuées à  $30 \pm 0,1^{\circ} \text{C}$  au viscosimètre d'OSTWALD, selon la méthode décrite par COURTOIS et BUI KHAC DIEP (1967).

La diminution de viscosité d'une solution d'hydroxyéthylcellulose<sup>4</sup> ou de pectine<sup>5</sup> en présence de filtrat de culture<sup>6</sup> et de tampon<sup>7</sup>, permet d'évaluer respectivement les activités cellulolytique et pectinolytique des souches étudiées.

Des témoins sont effectués en portant le filtrat de culture à ébullition pendant 20 minutes (ou en le remplaçant par de l'eau distillée stérilisée).

Les résultats sont exprimés en % de diminution de viscosité en faisant la moyenne de deux répétitions par essai et déduction faite de l'essai témoin.

#### 1 - 4. — Recherche des pectinéméthylestérases (PME) et des polygalacturonases (PG).

1. Composition du milieu:  $\text{MgSO}_4$ , 7  $\text{H}_2\text{O}$ : 0,5 g;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ : 0,6 g;  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ : 0,4 g;  $\text{FeSO}_4$ : 0,01 g;  $\text{KCl}$ : 0,2 g;  $\text{CaCO}_3$ : 2,5 g; Extrait de levures: 1 g; Asparagine: 1 g; Arginine: 1 g; Eau distillée: 1 litre.

2. Cellulose mikrokristallin MERCK: 10 g/l.

3. Pectin aus Aepfeln FLUKA: 14 g/l.

4. HEC Mittelviskos (FLUKA) en solution à 2 % dans l'eau distillée, 13,6 ml.

5. Pectin aus Aepfeln (FLUKA) en solution à 1,5 % dans l'eau distillée, 13,6 ml.

6. Filtrat de culture: 1,7 ml.

7. Tampon phosphate-citrate (Mac Ilvaine) pH 5, 1,7 ml.

a) La PME permet l'hydrolyse des groupements méthylesters de la pectine avec apparition de groupements acides et d'alcool méthylique.

La mesure de l'activité enzymatique repose sur le dosage par la soude de l'acidité résultant de cette hydrolyse (méthode de DEMAIN et PHAFF, 1957, décrite par TOUZÉ, 1964).

L'activité PME est exprimée en microéquivalents de groupements esters hydrolysés pour 100 ml de filtrat de culture après 2 heures d'incubation à  $30^{\circ} \pm 0,1^{\circ} \text{C}$ .

b) L'action des PG scindant les composés pectiques en chaînes plus courtes se traduit par l'apparition de groupements réducteurs. Ceux-ci sont dosés par iodométrie après 3 heures d'incubation à  $30^{\circ} \pm 0,1^{\circ} \text{C}$ . (Méthode de JANSEN et MAC DONNELL modifiée, décrite par WINSTEAD et WALKER, 1954). Les activités PG sont exprimées en microéquivalents (iode) de groupements réducteurs apparus pour 100 ml de filtrat de culture.

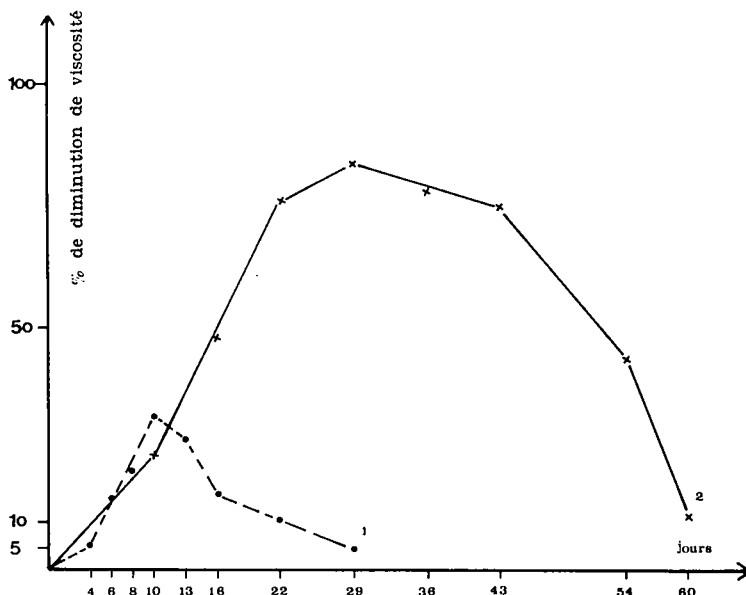
### 1 - 5. — Extraction et dosage des protéines mycéliennes.

Le mycélium récupéré après centrifugation est congelé puis broyé, en présence de sable et de NaCl à 9 ‰. Cette double opération est répétée plusieurs fois. Après centrifugation les protéines présentes dans le surnageant sont dosées selon la méthode LOWRY et al. (1954).

## 2. — RÉSULTATS (Tableau 1).

### 2 - 1. — Activités cellulolytiques (graphique 1).

Production maximale: L'activité cellulolytique de *Fomes annosus* est 2,6 fois supérieure à celle de *Rosellinia quercina*. Les filtrats de culture de ces 2 champignons provoquent respectivement une diminution de viscosité maximale de la solution d'hydroxyéthylcellulose de 84 et de 32 %.



Graphique 1. — Activité cellulolytique de *Rosellinia quercina* (1) et *Fomes annosus* (2).

TABLEAU I. — Activité pectinolytique et cellulolytique de *Fomes annosus* et *Rosellinia quercina*.

Nombre de jours de culture	<i>Fomes annosus</i>					<i>Rosellinia quercina</i>			
	Protéines mycéliennes (1)	PME (2)	PG (3)	Activité pectinolytique mesurée par viscosimétrie (4)	Activité cellulolytique (5)	Protéines mycéliennes (1)	PME (2)	Activité pectinolytique mesurée par viscosimétrie (4)	Activité cellulolytique (5)
4	—	—	—	—	—	56	160	2	5,5
6	—	—	—	—	—	120	200	5	15
8	—	—	—	—	—	550	430	11,5	21
10	110	200	0	0	24	1062	160	17	32
13	—	—	—	—	—	1075	130	14	27
16	1260	1166	1000	2,5	48	1050	130	8,5	16
22	1716	1433	1100	9	76	799	0	0	11
29	3600	1833	800	15	84	720	—	—	4
36	3740	2233	700	16,5	78	—	—	—	—
43	1925	1566	400	14	75	—	—	—	—
54	—	1166	300	10	44	—	—	—	—
60	—	—	—	—	12	—	—	—	—

(1) Protéines mycéliennes en mg (Mesures effectuées sur le milieu contenant de la pectine).

(2) Microéquivalents de groupements esters hydrolysés pour 100 ml de filtrat de culture.

(3) Microéquivalents de groupements réducteurs apparus rapportés à 100 ml de filtrat de culture.

(4) % de diminution de viscosité d'une solution de pectine à 1 % après 7 heures d'incubation à  $30 \pm 0,1^\circ \text{C}$ .

(5) % de diminution de viscosité d'une solution d'HEC à 2 % après 3 heures d'incubation à  $30 \pm 0,1^\circ \text{C}$ .

### Cinétique de la production de cellulases

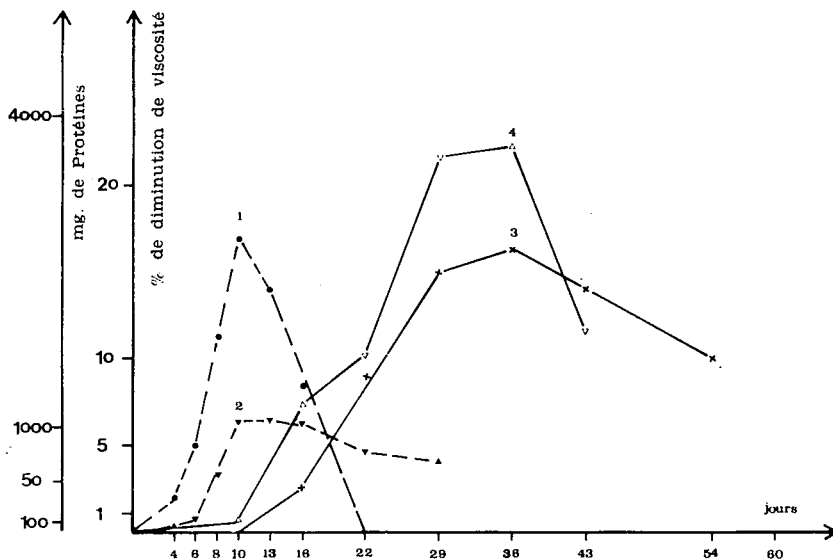
— durée de la production d'enzymes : chez *Rosellinia quercina* la production de cellulases dure 25 jours. Chez *Fomes annosus* elle est étalée pendant 50 jours.

— maximum d'activité : *Rosellinia quercina* atteint son maximum d'activité cellulolytique après 10 jours de culture alors que *Fomes annosus* ne l'atteint qu'au 29<sup>e</sup> jour.

Cette différence au niveau de la cinétique de la production des cellulases est en relation étroite avec la cinétique de la croissance de chacun de ces deux champignons : *Rosellinia quercina* poussant, sur tous les milieux de culture essayés, 2 à 3 fois plus vite que *Fomes annosus*.

### 2 - 2. — Activités pectinolytiques.

#### 2 - 2 - 1. — Activités mesurées par viscosimétrie (graphique 2).



Graphique 2. — Activité pectinolytique de *Rosellinia quercina* (1) et *Fomes annosus* (3). Quantité de protéines mycéliennes de *R. quercina* (2) et *F. annosus* (4).

*Production maximale* : les activités pectinolytiques des filtrats de culture de *Rosellinia quercina* et de *Fomes annosus* sont identiques : *Fomes annosus* provoquant une diminution de viscosité de la solution de pectine de 16,5 % et *Rosellinia quercina* de 17 % (courbes 1 et 3).

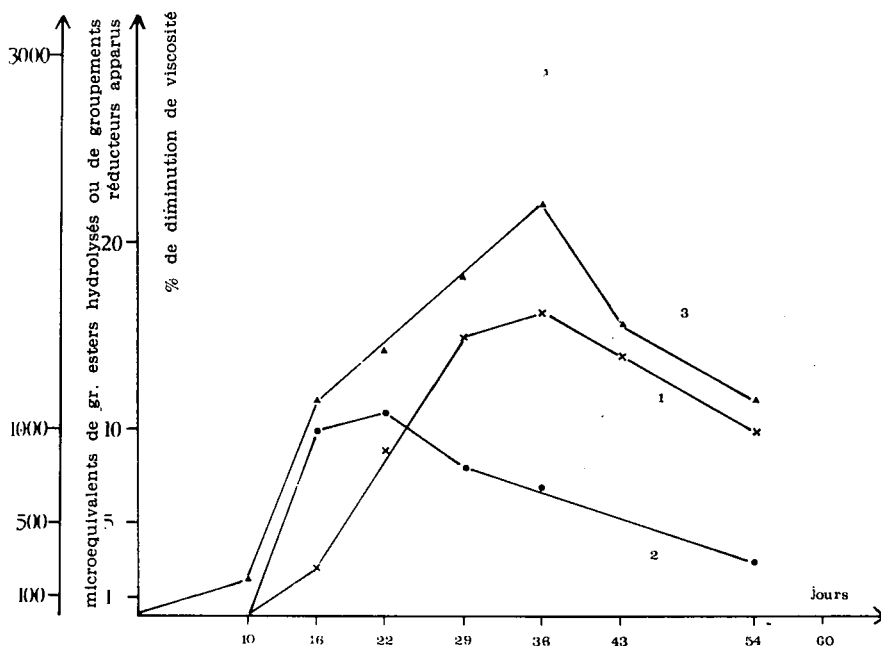
Si on ramène les activités pectinolytiques des deux espèces au même poids de protéines mycéliennes on constate alors que *Rosellinia quercina* est 4 fois plus actif que *Fomes annosus*.

### Cinétique de la production des pectinases :

— durée de la production : La production de pectinases est un peu moins étalée dans le temps que celle des cellulases : 40 jours pour *Fomes annosus* et 15 jours pour *Rosellinia quercina*.

— *maximum d'activité* : Le décalage dans le temps existant entre les productions maximales de pectinases de l'un et l'autre de ces champignons, est le même que celui existant au niveau des cellulases : le maximum est atteint au 10<sup>e</sup> jour pour *Rosellinia quercina* et au 36<sup>e</sup> jour pour *Fomes annosus*.

2 - 2 - 2. — *Nature et activité des enzymes pectinolytiques de Fomes annosus et Rosellinia quercina* (graphique 3).



Graphique 3. — *Activité pectinolytique de Fomes annosus.*

1. — Mesurée par viscosimétrie (Endo PG).
2. — Mesurée par dosage des groupements réducteurs apparus (Exo PG).
3. — Mesurée par dosage des fonctions acides apparues (PME).

*PME* : La PME est la première enzyme pectinolytique produite ; elle est mise en évidence dès le 10<sup>e</sup> jour de culture pour *Fomes annosus* et dès le 4<sup>e</sup> jour pour *Rosellinia quercina*.

Dans les jours suivants la production de la PME augmente plus rapidement que celle des pectinases mesurées par viscosimétrie, bien que les maxima de production soient enregistrés en même temps.

*PG* : Le début de la production des PG, qu'il soit apprécié par viscosimétrie ou par dosage des groupements réducteurs apparus, est postérieur à celui de la PME.

L'absence de proportionnalité directe entre l'activité pectinolytique mesurée par viscosimétrie et celle mesurée par dosage des groupements réducteurs est probablement l'indice d'une activité séquentielle des diverses PG.

Les premières PG produites par les filtrats de culture provoquant une forte apparition de groupements réducteurs sans pour autant entraîner une diminution importante de la viscosité du substrat sont des exoPG.

Le fait que l'optimum d'activité des endoPG mesurée par viscosimétrie ne précède pas celui de la PME indique que celles-ci contrairement aux exoPG, agissent sur des substrats faiblement méthylés.

La souche de *Rosellinia quercina* nous a été fournie par la Station de Pathologie végétale de l'I.N.R.A. de Clermont-Ferrand et celle de *Fomes annosus* par Mme A. DAVID.

#### RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- COURTOIS J.-E. et BUI KHAC DIEP, 1967. — Recherches sur le dosage des cellulases et hémicellulases dans les préparations pharmaceutiques. IV. Emploi de l'hydroxyéthylcellulose comme substrat. Ann. Pharm. Fr. 25, n° 3, 181-196.
- DEMAIN A.-L. et PHAFF H.-J., 1957. — Recent advances in the enzymatic hydrolysis of pectic substances. Wallerstein Lab. comm., 20, 119-131.
- REESE E. T. et LEVINSON H. S., 1952. — A comparative study of the breakdown of cellulose by microorganisms. Physiol. Plant., 5, 345-366.
- TOUZE A., 1964. — L'antracnose du Melon. Etude de quelques manifestations physiologiques. (Thèse, Toulouse, inédit), p. 30-33.
- WINSTEAD N. N. et WALKER J. C., 1954. — Production of vascular browning by metabolites from several pathogens. Phytopathology, 44, 153-158.

Université Claude-Bernard Lyon I,  
Laboratoire de Mycologie associé au C.N.R.S.,  
Bâtiment 405, 43, bd du 11-Novembre-1918, F - 69621 Villeurbanne.

### MICROFLORE DES AIGUILLES DE SAPIN *ABIES ALBA* MILL. : BACTÉRIES ET LEVURES

par M. FAURE-RAYNAUD et F. GOURBIÈRE.

Résumé. — Mise en évidence de bactéries et levures sur les aiguilles de sapin *Abies alba* Mill. Evolution lors de la sénescence des aiguilles — variations saisonnières. Importance des bactéries dans cette microflore.

#### INTRODUCTION.

De nombreux travaux ont été consacrés à la microflore, bactéries, levures et champignons de la surface des feuilles. Certains résultats, obtenus depuis 1955 date d'apparition du terme de « phyllosphère » (LAST 1955), sont cités et commentés par LAST et DEIGHTON dans un article relatif à la microflore des feuilles vivantes (1965). Des espèces végétales variées, pomme de terre (HOLLOMON 1967), concombre (LEBEN 1961), légumineuses diverses (DICKINSON 1967 - STOUT 1960), ont fait l'objet de ces études. Celles relatives aux conifères concernent essentiellement les microfunges. Ils ont été trouvés soit sur les feuilles de l'arbre : mélèze, épicéa, pin (BIRTI 1956) soit sur la litière (pin sylvestre) à la dégradation de laquelle ils participent (KENDRICK et BURGESS 1962). Les autres microorganismes, levures et bactéries, ont rarement été recherchés sur les conifères. Seuls *Larix decidua* (McBRIDE 1970) et *Pinus strobus* (LEBEN 1972) semblent avoir été étudiés dans ce but.

Nous avons tenté de mettre en évidence les microorganismes des feuilles du sapin *Abies alba* Mill. Les méthodes employées nous ont conduits à associer levures et bactéries. Les champignons ont fait l'objet d'une étude séparée (GOURBIÈRE 1974 a-b, 1975).