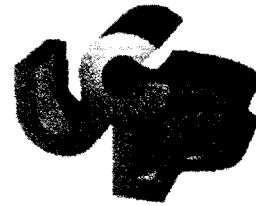




enssib
Ecole Nationale Supérieure
des Sciences de l'Information
et des Bibliothèques



Université
Claude Bernard
Lyon I

DESS Informatique Documentaire
Rapport de recherche bibliographique

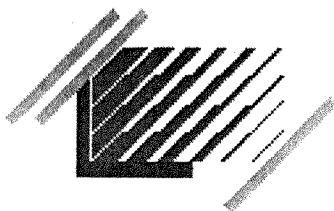
**Rôle des protéases fongiques dans la
phytopathogénèse**

Ivan Couzinet

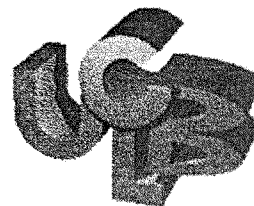
Sous la direction de

Michel Fèvre
UMR/CNRS 5534
Laboratoire de Biologie Cellulaire Fongique
Université Claude Bernard Lyon I
43 boulevard du 11 novembre 1918
69622 Villeurbanne Cedex

Année 1997-1998



enssib
Ecole Nationale Supérieure
des Sciences de l'Information
et des Bibliothèques

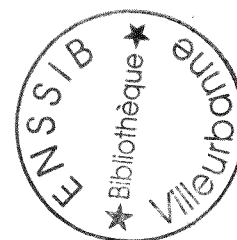


Université
Claude Bernard
Lyon I

DESS Informatique Documentaire
Rapport de recherche bibliographique

**Rôle des protéases fongiques dans la
phytopathogénèse**

Ivan Couzinet



Sous la direction de

Michel Fèvre
UMR/CNRS 5534
Laboratoire de Biologie Cellulaire Fongique
Université Claude Bernard Lyon I
43 boulevard du 11 novembre 1918
69622 Villeurbanne Cedex

Année 1997-1998

1998
ID
5

Je tiens à remercier vivement :

Mr FEVRE pour sa gentillesse, sa disponibilité et la confiance qu'il m'a témoigné.

Mme BLEUZEN pour l'aide qu'elle m'a apporté dans la rédaction du résumé en anglais.

RESUME

Les champignons pathogènes des plantes émettent une grande variété d'enzymes extracellulaires lorsqu'ils parasitent leur hôte. Certaines sont connues pour jouer un rôle dans la phytopathogénèse tandis que d'autres, comme les protéases ont un rôle plus flou. Il semblerait néanmoins que les protéases acides aient un rôle pathogène significatif, en particulier lors des premières étapes de l'infection, ce qui n'a pas pu être montré pour les protéases alcalines. Les différents rôles de ces protéases sont discutés dans cette étude.

DESCRIPTEURS

protéase, phytopathogène, champignon

ABSTRACT

Phytopathogenic fungi produce a wide variety of extracellular enzymes in a parasitic interaction with a host plant. Many of these enzymes are known to play a key part in the process of plant diseases while others, like proteinases, have a less defined part. It seems, however, that acid proteases are important for pathogenesis, especially in the primary stages of infection while this has not been proved for alkaline proteases. The different roles played by fungal endoproteases are discussed and investigated in this study.

KEYWORDS

protease, plant pathogen, fungus

SOMMAIRE

PREMIERE PARTIE : METHODE DE RECHERCHE BIBLIOGRAPHIQUE

I - RECHERCHE D'OUVRAGES GENERAUX.....	1
II - UTILISATION DES BASES DE DONNEES.....	1
1 - INTRODUCTION.....	1
2 - METHODOLOGIE.....	2
a) Repérage des mots-clefs de la question.....	2
b) Règles utilisées pour l'interrogation.....	2
c) Trouver les bases de données à utiliser.....	3
d) Etablissement de l'équation de recherche.....	4
e) Temps et coût de la recherche sur Dialog.....	6
III - RECHERCHE SUR LE WORLD WIDE WEB	7
1 - MOTEURS DE RECHERCHES UTILISÉS	7
2 - INTERROGATION D'ALTA VISTA.....	7
3 - RÉSULTATS ET CRITIQUE	7
IV - AUTRES METHODES POUR L'OBTENTION DE REFERENCES.....	8
V - OBTENTION DES DOCUMENTS PRIMAIRES.....	9
1 - METHODOLOGIE.....	9
2 - COÛT RELATIF À L'OBTENTION DES DOCUMENTS PRIMAIRES	9
VI - COUT TOTAL DE LA RECHERCHE BIBLIOGRAPHIQUE.....	9

DEUXIEME PARTIE : SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

INTRODUCTION.....	10
I - LES DIFFÉRENTS TYPES DE PROTÉASES	11
II - LOCALISATION, PRODUCTION ET CARACTERISTIQUES DES PROTÉASES FONGIQUES.....	12
1- LOCALISATION.....	12
2- PRODUCTION	13
3- CARACTÉRISTIQUES ET PROPRIÉTÉS	13
III - ROLE DES PROTÉASES FONGIQUES	14
1- APPARITION PRÉCOCE DES PROTÉASES LORS DE L'INFECTION.....	14
2- DÉGRADATION DES PROTÉINES PRÉSENTES DANS LA PAROI DES CELLULES VÉGÉTALES.....	15
3- MORT CELLULAIRE.....	16
4- HYDROLYSE DES INHIBITEURS ET DES ENZYMES SYNTHÉTISÉS PAR LES PLANTES.....	16
5- RELATION ENTRE PROTÉASE ET VIRULENCE.....	17
a) Les protéases alcalines	17
b) Les protéases acides	17
6- RÉSUMÉ DES DIFFÉRENTS RÔLES REMPLIS PAR LES PROTÉASES FONGIQUES	18
CONCLUSION	19

TROISIEME PARTIE : REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

I - OUVRAGES.....	20
II - PERIODIQUES	20
III - ARTICLES INTERNET	29

PREMIERE PARTIE

METHODE DE RECHERCHE BIBLIOGRAPHIQUE

I - RECHERCHE D'OUVRAGES GENERAUX

Avant d'essayer de trouver des documents qui permettent de répondre précisément à la question posée, il est utile de rechercher des ouvrages qui puissent donner une approche globale du sujet afin d'améliorer sa compréhension.

Pour cela, une visite de la Salle Chercheurs de la Bibliothèque Universitaire Lyon I s'est imposée et trois ouvrages ont été sélectionnés, tous d'origine anglosaxonne dont les références figurent dans la liste bibliographique. Ces livres ont été utiles pour rédiger l'introduction de la deuxième partie de ce rapport.

II - UTILISATION DES BASES DE DONNEES

1 - Introduction

L'utilisation des bases de données permet d'avoir accès à des références de périodiques, ouvrages, brevets, congrès répondant à une question précise donnée par l'utilisateur. Dans certains cas, il est aussi possible d'avoir accès à un résumé, le plus souvent élaboré par l'auteur du document.

L'interrogation des bases de données s'est faite par le serveur DIALOG basé en Californie, USA. Cette interrogation peut se faire de deux manières différentes : soit en utilisant le réseau téléphonique, soit en utilisant Internet. Nous nous sommes plutôt orientés à l'ENSSIB vers une liaison via le réseau téléphonique numérique de British Telecom qui nous permet un accès et un téléchargement plus rapide que par Internet.

2 - Méthodologie

a) Repérage des mots-clefs de la question

Pour une première connection, il est nécessaire de repérer tous les mots-clefs qui puissent nous fournir une réponse à la question posée, de manière à élaborer une première équation de recherche.

Rôle des protéases d'origine fongique dans la phytopathogenèse.

Les termes intéressants identifiés sont :

Protéase
Fongique
Phytopathogenèse

L'étape suivante est d'essayer de recenser tous les termes plus ou moins synonymes de ces mots-clefs de manière à obtenir une recherche la plus exhaustive possible. Sachant que pour une recherche d'informations scientifiques, la langue internationale est l'anglais, il faut connaître l'équivalent anglo-saxon de ces termes.

Une protéase est une enzyme qui hydrolyse d'autres protéines. Les termes anglais qui viennent immédiatement à l'esprit sont : **protease, proteases, proteinase, proteinases** qui sont tous des équivalents.

L'adjectif fongique désigne des champignons. Les termes retenus sont donc : **fungal, fungus, fungi**.

La phytopathogenèse est un terme qui définit la création d'une maladie chez les plantes. Les mots-clefs correspondants sont : **phytopathogenesis, phytopathogenicity, plant disease**.

b) Règles utilisées pour l'interrogation

L'interrogation libre ne peut se faire que sur des mots simples. Si l'on souhaite effectuer une recherche sur un groupe de mots, on doit utiliser l'opérateur de proximité (*w*) que l'on place entre chaque terme composant le groupe de mots.

Les règles de syntaxes veulent que l'on utilise l'opérateur and pour effectuer une recherche sur plusieurs termes dont on souhaite la mention dans l'article obtenu et l'opérateur or pour une recherche sur plusieurs termes équivalents. Pour croiser une recherche entre deux expressions contenant l'opérateur or, on place chaque expression entre parenthèses et on relie les deux à l'aide de l'opérateur and. On peut utiliser une troncature en fin de mots en la faisant figurer par ?.

c) Trouver les bases de données à utiliser

Pour une première interrogation de DIALOG, il n'est pas nécessaire de connaître précisément la base de données que l'on doit consulter. En effet, DIALOG possède la fonctionnalité de fournir toutes les bases de données utiles en saisissant une équation de recherche sommaire à l'aide de la commande *select* (S) par le Dialindex (obtention en tapant B411).

Ainsi, le repérage des bases de données s'est fait en saisissant :

?s (protease? or proteinase?) and fung? and plant?

Le tableau suivant récapitule les résultats obtenus :

Numéro et Nom de la base de données	Nombre de références
73: EMBASE_1974-1997/Nov W2	1537
50: CAB Abstracts_1972-1997/Oct	451
10: AGRICOLA_70-1997/Nov	423
348: EUROPEAN PATENTS_1978-1997/Nov W2	389
434: Scisearch(R) Cited Ref Sci_1974-1997/Nov W4	328
285: BioBusiness(R)_1985-1997/Nov W4	220
144: Pascal_1973-1997/Oct	155
357: Derwent Biotechnology Abs_1982-1997/Nov B2	151
5: BIOSIS PREVIEWS(R)_1969-1997/Nov W4	134
76: Life Sciences Collection_1982-1997/Oct	109
94: JICST-EPlus_1985-1997/Oct W1	107
156: Toxline(R)_1965-1997/Oct	91
399: CA SEARCH(R)_1967-1997/UD=12721	57
155: MEDLINE(R)_1966-1997/Dec W4	46
71: ELSEVIER BIOBASE_1994-1997/Nov W1	31
149: IAC(SM)Health&Wellness DB(SM)_1976-1997/Nov W4	31
636: IAC Newsletter DB(TM)_1987-1997/Dec 01	13
315: ChemEng & Biotec Abs_1970-1997/Nov	7
358: Current BioTech Abs_1983-1997/Dec	6
370: Science_1996-1997/Sep W4	4
624: McGraw-Hill Publications_1985-1997/Nov 25	4
143: Biol. & Agric. Index_1983-1997/Oct	3
211: IAC Newsearch(TM)_1997-1997/Dec 01	2
40: Enviroline(R)_1975-1997/Oct	1
41: Pollution Abs_1970-1997/Nov	1
6: NTIS_64-1997/Dec W3	1

Parmi toutes ces bases, il faut repérer les plus intéressantes en se basant sur la spécialisation de la base de données. Ainsi, Embase est peut être la base qui contient le plus de références sur le sujet mais cette base est une base médicale qui ne traite pas des problèmes de pathologie végétale. De même, la base 348 n'est pas pertinente car le domaine que l'on doit étudier ne répond pas au domaine des brevets mais de la recherche fondamentale.

Les bases de données effectivement utilisées sont :

5 : Biosis
10 : Agricola
50 : CAB Abstracts
144 : Pascal
285 : Biobusiness
357 : Derwent Biotechnology
434 : Scisearch

d) Etablissement de l'équation de recherche

Une interrogation avec OneSearch, c'est à dire en balayant l'ensemble de ces bases de données, a permis d'obtenir un certain nombre de références qui ont fait l'objet d'une étude attentive sur le contenu des titre, résumé mais surtout des identificateurs utilisés pour effectuer l'indexation du document par la base de données. Ainsi, des termes communs à tous les documents pertinents ont pu être dégagés, de nouveaux synonymes auxquels on n'avait pas forcément pensé au début ont été trouvés et l'on a pu écarté un certain nombre de références ne répondant pas à la question initiale en utilisant l'opérateur *not* afin de réduire le bruit de fond (très important au début).

Les descripteurs ou les mots du titre retrouvés dans les documents utiles sont :

Proteinase ou protease ou endoprotease ou peptidase ou proteolytic activity ou proteolytic enzyme;

Plant pathogenic ou plant pathogen ou plant pathology ou phytopathogen ou phytopathogenicity ou phytopathogenesis ou plant.

Dans le document entier figurent aussi les termes : **Fungus ou fungi ou fungal**

Les termes apportant du bruit de fond et leur explication figurent dans le tableau suivant :

Terme à éliminer	Cause
Mycoparasite	Champignon pathogène de champignons phytopathogènes
Trichoderma harzianum	Champignon mycoparasite
Entomopathogen	Champignon parasite d'insectes
Erwinia	Bactérie phytopathogène
Pseudomonas	Bactérie phytopathogène
Xanthomonas	Bactérie phytopathogène
Aspergillus fumigatus	Champignon pathogène des animaux
Candida	Levure pathogène des animaux (famille des champignons)
Leucine aminopeptidase	Enzyme utilisée pour caractériser des champignons

Plutôt que de saisir une équation de recherche unique qui allonge les délais de réponse et augmente les risques de tout ressaisir à la suite de fautes de frappes, il est préférable d'effectuer l'interrogation en plusieurs étapes. De même, mieux vaut interroger les bases les unes après les autres que par le OneSearch.

La démarche finale est la suivante :

S (protease? or proteinase? or endoprote? or peptidase? or proteolytic(w)activit? or proteolytic(w)enzyme?)/TL,DE
 S S1 and fung?
 S S2 and (plant(w)patho? or plant? or phytopatho?)/TL,DE
 S S3 not mycoparasite
 S S4 not trichoderma
 S S5 not entomopatho?
 S S6 not erwinia
 S S7 not pseudomonas
 S S8 not xanthomonas
 S S9 not (aspergillus(w)fumigatus)
 S S10 not candida
 S S11 not (leucine(w)aminopeptidase)

Parmi toutes les bases consultées, il est à noter que plus de 90% des références de périodiques figurant dans cette bibliographie sont présentes dans la base Biosis. Viennent ensuite Pascal, Scisearch, Elsevier, Agricola. A noter que des bases comme Toxline n'ont fourni aucune référence pertinente. En résumé, il est donc possible d'avoir une bibliographie correcte en n'utilisant que Biosis.

La partie la plus longue de cette recherche bibliographique a été de sélectionner les références utiles parmi toutes celles proposées par les bases de données. En effet cette sélection s'est opérée à la main, en lisant chaque référence et son résumé lorsqu'il était présent. Puis les documents les plus intéressants ont été recherchés (recherche des documents primaires).

e) Temps et coût de la recherche sur Dialog

Le temps passé sur Dialog est d'environ 7 heures réparties sur 7 sessions d'interrogations.

Le coût total d'utilisation des bases de données est estimé à 143\$ (soit environ 887F) sachant qu'une recherche en situation professionnelle aurait eu un coût plus élevé du fait de contrats privilégiés entre l'ENSSIB et Dialog (contrats en vue d'une utilisation scolaire).

Durée d'interrogation de la session (h)	Coût total de la session (\$)
0.85	17.84
2.3	48.2
1.833	38.43
0.3	6.19
0.15	2.25
0.84	16
0.7	14
Total : 6.973	Total : 142.91

III - RECHERCHE SUR LE WORLD WIDE WEB

1 - Moteurs de recherches utilisés

Le moteur de recherche général Alta Vista (www.altavista.telia.com) a été utilisé, celui-ci étant le plus performant. C'est un robot qui balaye l'ensemble des pages Web. L'annuaire général Yahoo (www.yahoo.co.uk) a été également utilisé mais sans succès (les sites proposés n'ayant pas de rapport avec le sujet).

2 - Interrogation d'Alta Vista

Il est plus judicieux d'utiliser la requête évoluée qui permet d'optimiser la recherche à l'aide de l'élaboration d'une équation de recherche du type de celle utilisée pour l'interrogation des bases de données.

La syntaxe de l'équation de recherche est la même que pour Dialog à la différence de la troncature qui est ici l'étoile (*). De plus, les termes composés figurent entre guillemets au lieu du (*w*). Il n'a pas été utilisé de restriction du type *not* afin d'obtenir le plus de sites possibles.

L'équation de recherche est la suivante :

(protease* or proteinase* or endoprot* or peptidase* or "proteolytic activity" or "proteolytic enzyme*") and fung* and phytopatho*

3 - Résultats et critique

Alta Vista donne 40 sites répondant à la requête. Les sites sont normalement classés par ordre d'importance, le premier étant celui le plus pertinent. En fait, les sites qui ont été retenus pour cette étude sont répartis de façon homogène sur l'ensemble de la sélection fournie par Alta Vista.

Ces sites sont au nombre de 2 :

www.seqnet.dl.ac.uk/research/fgsc/asilomar/poster13.html

www.seqnet.dl.ac.uk/research/fgsc/asilomar/poster32.html

Ces deux sites contiennent les résumés détaillés de différentes études. Trois études sont particulièrement intéressantes (voir la 3^{ème} partie du rapport)

4 - Temps et coût

Le temps passé à l'utilisation d'Internet est d'environ 5h en 4 sessions. Les plages horaires correspondent au plein tarif pratiqué par France Télécom.

DONNEES DE BASE

Nombre de sessions d'utilisations	4
Nombre de minutes d'utilisation	300

DONNEES TARIFAIRES EN LOCAL

Tarif connection en zone rouge (F)	0,74
Crédit temps connection (mn)	3
Tarif minutes suivantes (F/mn)	0,28

COUT D'UTILISATION

Total connections (F)	2,96
Nombre de minutes suivantes	288
Total minutes suivantes (F)	80,64
Total recherche Internet (hors abonnements) (F)	83,6

IV - AUTRES METHODES POUR L'OBTENTION DE REFERENCES

Lorsqu'on a un article entre les mains, il est possible d'avoir accès à un certain nombre de références supplémentaires en étudiant la liste des références bibliographiques citées par l'auteur dans sa publication. Après avoir repérer les références intéressantes qui n'ont pas été trouvées par Dialog, il suffit de se procurer les documents primaires de la même façon qu'une référence donnée par une base de données.

V - OBTENTION DES DOCUMENTS PRIMAIRES

1 - Méthodologie

La recherche des documents a eu lieu en Salle Chercheurs, au 2^{ème} étage de la Bibliothèque de l'Université Claude Bernard à Villeurbanne (BU Lyon I).

Les noms des périodiques correspondant aux références les plus pertinentes ont été recherchés dans le catalogue papier des périodiques disponibles à la Bibliothèque puis l'emplacement en rayon a été soigneusement noté ainsi que la période dans le temps couverte par l'abonnement (de manière à s'assurer que l'année souhaitée était bien disponible). Les articles ont ensuite été photocopiés directement à partir des périodiques.

Lorsque la BU ne possédait pas les périodiques voulus, ceux-ci ont fait l'objet d'un prêt entre bibliothèques (PEB) sachant que ce service est facturé 28 F pour les 10 premières pages d'un article puis 14 F pour les pages suivantes.

2 - Coût relatif à l'obtention des documents primaires

	Photocopies	PEB
Nombre de documents	9	9
Coût	50 F	306 F
Total		356 F

VI - COUT TOTAL DE LA RECHERCHE BIBLIOGRAPHIQUE

Cout interrogation Dialog (F)	887
Cout recherche Internet (F)	84
Cout documents primaires (F)	356
Estimation coût recherche bibliographique (F)	~ 1330

DEUXIEME PARTIE

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

INTRODUCTION

Les champignons phytopathogènes sont des micro-organismes eucaryotes parasites des plantes. Puisque pathogènes, ils ont une incidence écologique et économique énorme. En détériorant l'aspect des plantes cultivées ou en détruisant les récoltes, ils provoquent de sérieuses pertes de productivité pour l'industrie agronomique et agro-alimentaire.

L'étude de la pathogénicité des champignons, c'est à dire la faculté de ces organismes à engendrer des maladies, intéresse les mycologistes depuis plus d'un siècle. Il est en effet reconnu que les champignons sont les microbes qui provoquent le plus de dommages aux plantes (19). A titre d'exemple, l'espèce *Cryphonectria parasitica* a dévasté l'équivalent de plus de 90.000 hectares de forêt de châtaigniers aux Etats-Unis ces 40 dernières années (55). Plus tragiquement, la destruction des récoltes de pommes de terre en Irlande par *Phytophthora infestans* vers le milieu du XIX^e siècle fut à l'origine d'une large famine qui causa la mort de centaines de milliers de personnes et l'émigration de plus d'un million et demi d'habitants vers les Etats-Unis (1).

Le cycle de développement des maladies dues à des microbes pathogènes débute toujours de la même façon : le parasite entre tout d'abord en contact avec la plante, au niveau de différentes zones (racines, tiges, feuilles, fruits, blessures) puis il se propage dans les tissus de l'hôte, causant des symptômes visibles. Etant donné que la plupart des champignons phytopathogènes sont véhiculés par l'air à l'état de spores, ce sont les organes aériens qui sont le plus touchés. Ces spores, de par leur nature biochimique, peuvent se fixer à des surfaces hydrophobes comme la cuticule des feuilles (pellicule protectrice formée de cutine) puis se mettre à germer lorsque la spécificité d'hôte est respectée (spécificité déterminée par des gènes d'avirulence chez le champignon) et que les conditions du milieu sont favorables (2).

A partir de là, le champignon essaye de pénétrer dans les tissus de la plante. La première barrière à laquelle il se heurte est la paroi de la cellule végétale, structure complexe composée de cellulose, d'hémicellulose, de substances pectiques et de composés protéinés (57). Le champignon se met alors à sécréter une multitude d'enzymes pour lui permettre de dépolymériser cette paroi et ainsi gagner les cellules qu'il va parasiter. Il produit également des toxines et des facteurs de croissance. Les enzymes d'origine fongique identifiées chez les plantes parasitées sont formées par les pectines méthyles estérases, les polygalacturonases, les cellulases, les hémicellulases, les ligninases, les phospholipases et les protéinases (3).

La relation parasitaire avec la plante hôte peut être biotrophique (la mort de la cellule végétale n'est pas une conséquence de l'infection) ou nécrotrophique (la pénétration du champignon est cause de mort cellulaire engendrant alors une nécrose des tissus). Certains champignons, les hémibiotrophes, présentent dans leur cycle de vie une phase biotrophique puis nécrotrophique. Les nécrotrophes produisent une large panoplie d'enzymes extra cellulaires tandis que les biotrophes en produisent beaucoup moins.

Parmi toutes les enzymes sécrétées par le champignon, certaines ont un rôle bien connu dans la phytopathogenèse, comme les enzymes pectinolytiques (les plus étudiées) ; mais pour ce qui est des protéases, leur rôle précis est encore sujet à caution et les avis diffèrent selon les auteurs et l'espèce de champignon étudiée. Dans cette synthèse, j'ai essayé de faire le point sur la situation actuelle et de rassembler les différents points de vue et hypothèses quant au rôle des protéases fongiques dans la phytopathogenèse végétale.

I - LES DIFFERENTS TYPES DE PROTEASES

Types de protéases	Spécificité d'action
Exoprotéases	Clivent les peptides et protéines en NH ₂ ou COOH terminal
▪ Aminopeptidases	Libèrent un acide aminé en NH ₂ terminal
▪ Dipeptidases	Hydrolysent des dipeptides en acides aminés
▪ Peptidyl peptidases	Libèrent des dipeptides de l'extrémité NH ₂
▪ Trypeptyl peptidases	Libèrent des tripeptides de l'extrémité NH ₂
▪ Peptidyl dipeptidases	Libèrent des dipeptides de l'extrémité COOH
▪ Carboxypeptidases	Libèrent un acide aminé à l'extrémité COOH
Carboxypeptidases de type sérine	
Métallocarboxypeptidases	
Carboxypeptidases de type cystéine	
▪ Oméga peptidases	Hydrolysent les ponts non peptidiques des peptides et protéines
Endoprotéases	Clivent les ponts peptidiques internes des peptides et protéines
▪ Endoprotéases de type sérine	
▪ Endoprotéases de type cystéine	
▪ Endoprotéases de type aspartique	
▪ Métallo-endoprotéases	
▪ Endoprotéases de type catalytique inconnu	

Les protéases fongiques les plus étudiées sont les endoprotéases. En effet, les protéases les plus répandues chez les champignons sont les sérines protéases et les aspartique protéinases (32). Ces enzymes, en hydrolysant les liaisons peptidiques, permettent de dépolymériser les protéines et de libérer ainsi des acides aminés et des peptides.

La liste qui suit fait état des protéinases sécrétées par quelques espèces de champignons nommées dans cette étude.

Espèce	Type d'endoprotéase	Références
<i>Botrytis cinerea</i>	Aspartique protéinases	41, 69
<i>Glomerella cingulata</i>	Aspartique protéinases	10, 86
<i>Cryphonectria parasitica</i>	Aspartique protéinases	8, 55
<i>Pyrenopeziza brassicae</i>	Sérine et cystéine protéases	84,5
<i>Verticillium dahliae</i>	Sérine protéases	16
<i>Cochliobolus carbonum</i>	Sérine protéases	43
<i>Uromyces viciae-fabae</i>	Métalloprotéases	54
<i>Gremmeniella abietina</i>	Métalloprotéases	48
<i>Cladosporium cucumerinum</i>	Autres	58

II - LOCALISATION, PRODUCTION ET CARACTERISTIQUES DES PROTEASES FONGIQUES

1- Localisation

Rey s'est proposé en 1984 d'étudier la relation qui pouvait exister entre les protéases et les plantes hôtes à l'aide de techniques immunologiques(56). Pour ce faire, il a utilisé des anticorps dirigés contre la protéase purifiée de *Nectria galligena* et un conjugué fluorescent permettant de localiser la présence des protéases dans les tissus infectés. La fluorescence a été retrouvée au niveau extracellulaire et intracellulaire des hyphes ainsi qu'au niveau de la paroi des cellules hôtes, démontrant par là-même la présence de protéase dans les tissus infectés. Les protéases seraient donc synthétisées dans l'hyphes puis sécrétées dans une matrice extracellulaire, gagnant

alors les parois végétales. D'autres travaux basés sur les mêmes techniques d'utilisation d'anticorps anti-protéases ont confirmé ces observations, localisant l'activité protéolytique après croissance du champignon au niveau de la paroi des cellules végétales (18, 23). Il semble donc que ce phénomène se produise chez l'ensemble des champignons phytopathogènes.

2- Production

De nombreuses études *in vitro* ont été réalisées de manière à déterminer les conditions à l'origine de la sécrétion des protéases fongiques. Il apparaît que la production des protéases est induite par des sources solubles ou insolubles de protéines (16).

Des expériences de culture de champignons sur différents milieux nutritifs révèlent que les milieux les plus inducteurs d'activité protéolytique fongique sont ceux qui contiennent le collagène comme source de protéine. Viennent ensuite les milieux contenant de la caséine ou de la gélatine ou encore de l'albumine (43). De plus, cette production n'intervient qu'une fois que le milieu est épuisé en source d'azote directement disponible (32). Certaines études ont même montré que le simple ajout d'ammonium dans le milieu de culture une fois que la sécrétion de protéases avait commencée suffisait à stopper la synthèse (63).

Les protéases fongiques ne sont donc produites que si le milieu de culture contient une source de protéines et une fois que toute autre source d'azote est épuisée, ce qui suggère que ce n'est pas tant la présence de protéines dans le milieu qui est un facteur déclenchant mais plutôt l'absence de source d'azote pour le champignon qui le conduit à sécréter des protéases. D'après ces observations, on serait contraint de dire que les protéases fongiques servent donc à la nutrition du champignon dans un milieu où est absente toute source d'azote directement assimilable, comme l'ammonium.

3- Caractéristiques et propriétés

Les protéases fongiques, comme toutes enzymes, présentent des activités protéolytiques optimales pour certains pH, appelés pH optimum. D'après ces caractéristiques, on a généralement l'habitude de ranger les protéases selon deux catégories : les protéases acides (si leur pH

optimum est acide) et les protéases alcalines (si leur pH optimum est basique).

Les aspartique protéases de *Botrytis cinerea* et de *Cryphonectria parasitica* sont des protéases acides (41, 82, 25) ; les sérines protéases de *Verticillium dahliae*, de *Verticillium albo-atrum*, de *Pyrenopeziza brassicae* et de *Cochliobolus carbomum* sont des protéases alcalines (68, 84, 85).

Nous pouvons dire que d'une manière générale les aspartique protéases sont des protéases acides et que les sérine protéases sont des protéases alcalines.

En ce qui concerne les propriétés des protéases fongiques, plusieurs études ont montré que ces enzymes dégradent spécifiquement les protéines fibreuses riches en hydroxyproline (16, 54, 57).

III - ROLE DES PROTEASES FONGIQUES

Le rôle précis joué par les protéases fongiques lors de la phytopathogenèse relève presque du cas particulier. Quelques tendances peuvent cependant être dégagées selon qu'il s'agit de protéases acides ou de protéases alcalines.

1- Apparition précoce des protéases lors de l'infection

Quelques travaux indiquent que les protéases acides sont les premières enzymes produites lors de l'infection, avant les polygalacturonases et les xylanases, ce qui laisse supposer qu'elles agissent lors des premières étapes de l'infection (41, 42, 81). De plus, si l'on traite des spores avec un inhibiteur spécifique des aspartique protéinases (la pepstatine) avant de les inoculer sur les tissus de la plante-hôte, on observe une réduction du niveau d'infection démontrant ainsi le rôle premier des protéases dans la pathogenèse (42).

2- Dégradation des protéines présentes dans la paroi des cellules végétales

Cette capacité est retrouvée dans tous les cas, qu'il s'agisse de protéases acides (41, 86) ou alcalines (58, 75). Les protéases facilitent la pénétration du champignon à travers la paroi des

cellules végétales, en brisant les glycoprotéines de structure qui contribuent à la stabilité de la paroi, comme l'extensine (6, 41). En effet, la paroi constitue une barrière protectrice contre les micro-organismes et la perte de cohérence qui résulte de l'action des protéases (aussi appelée macération) permet au champignon de progresser dans l'hôte.

Une exception a été relevée chez *Botrytis cinerea* où la sécrétion de protéases ne joue aucun rôle dans la macération des tissus, celle-ci ne résultant que de l'action des enzymes pectinolytiques (42).

Par ailleurs, certains auteurs ont émis l'hypothèse selon laquelle l'hydrolyse des protéines pariétales de la plante favoriserait la survie du pathogène et sa colonisation dans un environnement limité du point de vue nutritionnel (6). Les protéases permettraient donc d'apporter au champignon les acides aminés dont il a besoin pour son métabolisme (22, 32, 37, 57). L'utilisation d'un inhibiteur de protéases (le pyriméthanile), qui agit simplement sur les processus de sécrétion, n'a pas le même effet sur la croissance du pathogène selon que la source d'azote dans le milieu est sous forme de protéines ou d'ammonium (37). Il apparaît que cette molécule est la plus active lorsque le champignon doit utiliser des enzymes extracellulaires pour hydrolyser les protéines, ce qui indique que le champignon utilise des protéases pour se nourrir.

3- Mort cellulaire

Le développement de l'activité des protéases aspartiques coïncide avec la mort des cellules hôtes, avant même que les autres enzymes qui dégradent la paroi ne soient apparues (41). Cette mort cellulaire est à l'origine de la nécrose des tissus. La phytotoxicité des protéases acides est indirectement dû à l'effet toxique de la libération de composés des parois végétales sous l'action des protéases aspartiques (APr) et autres enzymes (42).

In vitro, la protéase aspartique de *Botrytis cinerea* entraîne la mort des cellules de carotte en 10 minutes. Cependant, si l'on utilise des protoplastes (cellules végétales dépourvues de paroi), l'ajout d'APr n'a aucun effet sur la viabilité de ces cellules. La présence de la paroi végétale semble donc essentielle pour la phytotoxicité des protéases. En effet, si l'on ajoute cette fois des parois végétales au milieu contenant les protoplastes et l'APr, on observe une mort des protoplastes. Les APr, en libérant des molécules composant les parois végétales, provoquent

donc des dommages aux cellules végétales. Ces composés toxiques sont solubles : des résidus insolubles de paroi obtenus après action enzymatique ne sont pas toxiques quand on les ajoute à une culture de cellules. De plus, l'autoclavage de la fraction soluble détruit toute activité toxique. Les protéases aspartiques libèrent donc un agent toxique thermosensible de bas poids moléculaire, contenu dans la paroi végétale, qui interagit avec la membrane plasmique. Ces caractéristiques font tout de suite penser à celles des radicaux libres. En fait, ce qui se passe, c'est que les protéases acides facilitent l'action des endo-pectine lyases qui attaquent la paroi et relarguent des radicaux libres à l'origine de phénomènes d'oxydation au niveau des acides gras de la membrane plasmique (42). Cette oxydation au niveau de la membrane plasmique entraîne des altérations dramatiques dans la perméabilité membranaire. Tous ces phénomènes contribuent à la mort des cellules et à l'observation d'une nécrose.

4- Hydrolyse des inhibiteurs et des enzymes synthétisés par les plantes

Quand un micro-organisme pénètre dans une plante, celle-ci ne reste pas passive et déclenche des mécanismes de résistance en produisant des inhibiteurs contre les enzymes fongiques, notamment contre les protéases (5, 13, 47). Cette activité de défense peut supprimer la croissance du mycélium et inhiber l'activité des protéases extracellulaires sécrétées par le champignon (16). La seule présence chez les plantes d'un inhibiteur actif contre les protéases fongiques suffit à démontrer le rôle de ces protéases dans le processus infectieux.

Cependant, les inhibiteurs des protéases ne sont actifs que contre les sérines protéases (42, 47) - c'est-à-dire les protéases alcalines. Les protéases acides n'étant pas concernées par ces inhibiteurs, elles vont pouvoir s'attaquer directement aux protéines inhibitrices produites par la plante hôte. Ainsi, la protéase acide de *Fusarium culmorum* peut dégrader différentes protéines végétales, comme par exemple l'inhibiteur de la trypsine produit par le soja (75). La simple hydrolyse, même partielle suffit à causer l'inactivation de ces inhibiteurs.

Ainsi, la production de protéases acides permet de faciliter l'extension du pathogène dans les cellules hôtes en inactivant les protéines végétales impliquées dans les mécanismes de défense comme des enzymes ou des inhibiteurs de nature protéique (41).

5- Relation entre protéase et virulence

a) Les protéases alcalines

Dans les articles étudiés, aucune corrélation n'a pu être faite entre la sécrétion de protéases alcalines et l'apparition des symptômes de maladie chez les plantes.

Si l'on établit des mutants de *Cladosporium cucumerinum* après irradiation aux UV, les mutants qui sécrètent une moins grande quantité de protéases durant la croissance sur des plants de concombre sont aussi pathogènes que la souche de phénotype sauvage, ce qui indique que les protéases de cette espèce n'ont pas un rôle important dans la pathogénèse (58). De même, si l'on opte pour une stratégie d'interruption du gène codant pour une protéase alcaline chez *Cochliobolus carbonum*, la perte d'activité protéolytique qui en résulte ne cause aucun changement détectable dans la pathogénicité de la souche mutante (85). Cette interruption n'a aucun effet sur l'expression des autres enzymes extracellulaires et n'a pas d'effet sur les lésions des tissus végétaux. Les protéases alcalines de ce champignon ne sont donc ni un facteur de pathogénicité essentiel ni un facteur majeur de virulence. Toujours chez le même champignon, une interruption de l'ensemble des gènes codant pour les enzymes qui dégradent la paroi des cellules végétales n'a aucun effet (85).

b) Les protéases acides

Une expérience simple, qui consiste à ajouter des protéases aspartiques dans une suspension de spores, donne en résultat une nette augmentation des symptômes de maladie chez les plantes (42). D'autres études basées sur des techniques de biologie moléculaire permettent de vérifier le rôle des protéases acides en tant que facteurs de virulence.

Une première expérience a consisté à transformer un mutant non pathogène de *Pyrenopeziza brassicae* par des gènes provenant d'une banque de gènes du champignon à phénotype sauvage et à cribler les transformants pour la restauration de la pathogénicité (5, 84). Dans un second temps, il s'agissait de repérer dans chaque cas la présence d'une activité protéolytique. L'expérience a révélé que les mutants qui sont protéase⁻ sont soit non pathogène soit faiblement pathogène. A contrario, les mutants protéase⁺ sont pathogène⁺ ce qui suggère que les gènes permettant la production de protéase et ceux conférant le caractère pathogène de ce champignon sont les

mêmes ou reliés de manière très proche. En effet, un seul événement de recombinaison sur le mutant protéase⁻ pathogène⁻ suffit à restaurer le phénotype sauvage. De plus, même si un mutant protéase⁻ a été trouvé comme étant capable de pénétrer la cuticule de l'hôte, il montre une croissance faible dans la plante et n'est pas responsable de la nécrose des tissus (84).

Une autre expérience menée toujours sur le même champignon a consisté à surexprimer le gène codant pour une protéase aspartique, en effectuant une incorporation multiple de copies du gène (8). Le résultat est que cette surexpression provoque une augmentation de la nécrose sur l'écorce et le bois des châtaigniers.

Toutes ces expériences montrent à l'évidence que la production de protéase aspartique extracellulaire par ce champignon est requise dans la pathogénicité.

6- Résumé des différents rôles remplis par les protéases fongiques

Protéases acides

- ✓ Hydrolyse des protéines de structure des parois végétales.
- ✓ Macération des tissus végétaux.
- ✓ Nutrition à l'intérieur de l'hôte.
- ✓ Facilitation des endo-pectin lyases.
- ✓ Production de radicaux libres causant la mort de la cellule végétale.
- ✓ Hydrolyse d'enzymes végétales.
- ✓ Hydrolyse d'inhibiteurs végétaux.

Protéases alcalines

- ✓ Hydrolyse des protéines de structure des parois végétales.
- ✓ Macération des tissus végétaux.
- ✓ Nutrition à l'intérieur de l'hôte.

CONCLUSION

Les protéases des champignons phytopathogènes sont des enzymes extracellulaires produites pendant l'infection d'une plante. Leur action semble intervenir surtout durant les premières étapes de la pathogénèse. Ces protéases favorisent l'expansion du parasite dans les tissus de l'hôte, en désorganisant la paroi végétale par hydrolyse des protéines pariétales et en apportant la source d'acides aminés nécessaire à la croissance fongique.

De toutes les protéases, les protéases acides sont celles qui ont le plus d'effet chez la plante, sans doute de par le fait que leur pH d'action optimum correspond au pH interne de l'hôte. Leur relation avec la pathogénicité a pu être mise en évidence par quelques travaux. Il semblerait que les protéases acides interviennent dans les mécanismes de nécrose tissulaire. De plus, grâce à l'inactivation des inhibiteurs protéiques synthétisés par la plante, les protéases acides favoriseraient là-encore l'expansion du champignon en détruisant les défenses organisées par la plante en réponse à l'attaque par un pathogène.

TROISIEME PARTIE

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

La liste des références bibliographiques qui suit a été établie de manière à faciliter sa consultation. Cette liste alphabétique est divisée en trois parties, selon la nature du document auquel elle renvoie (ouvrage, périodique ou électronique). Le numéro devant chaque référence correspond aux renvois dans le texte.

I - OUVRAGES

- 1- Agrios G N. *Plant pathology*. Third edition. San Diego : Academic Press Inc., 1988. 803p.
- 2- Atlas R M, Bartha R. *Microbial ecology : fundamentals and applications*. Third edition. Redwood City : The Benjamin / Cummings Publishing Company Inc., 1993. 563p.
- 3- Dickinson C H, Lucas J A. *Plant pathology & plant pathogens*. Second edition, vol 6. Blackwell Scientific Publications Ltd., 1982. 229p.

II - PERIODIQUES

- 4- Abraham L D, Roth A, Saddler J N, et al. Growth, nutrition, and proteolytic activity of the sap- staining fungus *Ophiostoma piceae*, *Canadian Journal of Botany*, 1993, 71 (9), p1224-1230.
- 5- Ball A M, Ashby A M, Daniels M J, et al. Evidence for the requirement of extracellular protease in the pathogenic interaction of *Pyrenopeziza-brassicae* with oilseed rape, *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 1991, 38 (2), p147-161.
- 6- Battle I, Alston F H. Genes determining leucine aminopeptidase and mildew resistance from the ornamental apple, "White Angel", *Theoretical and Applied Genetics*, 1996, 93 (1-2), p179-182.
- 7- Cary J, Cleveland T E. Cloning of an alkaline protease gene from the aflatoxigenic fungus *Aspergillus-parasiticus*, 93rd General meeting of the American Society for Microbiology, Atlanta, Georgia, USA, May 16-20, 1993, *Abstr Gen Meet Soc Microbiol*, 1993, 93(0), p321.

- 8- Choi G H, Pawlyk D M, Rae B, et al. Molecular analysis and overexpression of the gene encoding endothiapepsin, an aspartic protease from *Cryphonectria parasitica*, *Gene*, 1993, 125 (2), p135-141.
- 9- Choi GH, Shapira R, Nuss DL. Cotranslational autoproteolysis involved in gene expression from a double-stranded RNA genetic element associated with hypovirulence of the chestnut blight fungus, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1991, 88 (4), p1167-1171.
- 10- Clark S J, Templeton M D, Sullivan P A. A secreted aspartic proteinase from *Glomerella cingulata*: Purification of the enzyme and molecular cloning of the cDNA, *Microbiology*, 1997, 143 (4), p1395-1403.
- 11- Cleveland T E, Black L L. Partial purification of proteinase inhibitors from tomato plants infected with *Phytophthora infestans*, *Phytopathology*, 1983, 73 (5), p664-670.
- 12- Cooper R M. The role of cell wall-degrading enzymes in infection and damage, Plant diseases. infection, damage and loss, Meeting, London, England, Dec 1982, *Blackwell Scientific publications, Inc*, 1984, 0(0), p13-28, ISBN. 0-632-01126-2.
- 13- De Wit P J G M, Lauge R, Honee , et al. Molecular and biochemical basis of the interaction between tomato and its fungal pathogen *Cladosporium fulvum*, *Antonie van Leeuwenhoek*, 1997, 71 (1-2), p137-141.
- 14- Deising H, Rauscher M, Haug M, et al. Differentiation and cell-wall degrading enzymes in the obligately biotrophic rust fungus *Uromyces-viciae-fabae*, *Canadian Journal of Botany-Revue Canadienne de Botanique*, 1995, V73, S1 A-, pS624-S631.
- 15- Dewar M D, Walker G J. Hydrolysis of alpha-1 3 glucosidic linkages by extracellular enzymes of *Cladosporium-resinae*, *Journal of Dental Research*, 1973, 52 (3), p573.
- 16- Dobinson K F, Lecomte N, Lazarovits G. Production of an extracellular trypsin-like protease by the fungal plant pathogen *Verticillium dahliae*, *Canadian Journal of Microbiology*, 1997, 43 (3), p227-233.

- 17- Fric F, Wolf G. Protease activity in powdery mildew barley leaves, *Biologia (Bratislava)*, 1992, 47 (4), p307-315.
- 18- Gharibian S, Hoffert C, Abraham L D, et al. Localizing an *Ophiostoma piceae* proteinase in sapwood of four tree species using polyclonal antibodies, *New Phytologist*, 1996, 133 (4), p673-679.
- 19- Hamer JE, Holden DW. Linking approaches in the study of fungal pathogenesis: A commentary, *Fungal Genetics and Biology*, 1997, V21, N1 (FEB), p11-16.
- 20- Hancock F F, Millar R L. Association of cellulolytic, proteolytic, and xylolytic enzymes with southern anthracnose, spring black stem, and *Stemphylium* leaf spot of alfalfa, *Phytopathology*, 1965, 55, p356-360.
- 21- Hellmich S, Schauz K. Production of extracellular alkaline and neutral proteases of *Ustilago maydis*, *Experimental mycology*, 1988, v12 (3), p223-232.
- 22- Hislop E C, Paver J L, Keon J P R. An acid protease produced by *Monilinia-fructigena* in vitro and in infected apple fruits and its possible role in pathogenesis, *Journal of General Microbiology*, 1982, 128 (4), p799-808.
- 23- Hoffert C., Gharibian S., Brown D.L., et al. Immunolocalization of a proteinase of the sap-staining fungus *Ophiostoma piceae* using antibodies to proteinase K, *Canadian Journal of Botany*, 1995, 73/10, p1604-1610.
- 24- Ibragimov R I. Suppression of extracellular proteinase activity of pathogenic fungus *Fusarium* sp. by inhibitors of seeds and vegetative organs of plants, *Doklady Rossiiskoi Akademii Sel'skokhozyaistvennykh Nauk*, 1997, 0 (2), p15-17.
- 25- Jara P, Gilbert S, Delmas P, et al. Cloning and characterization of the EAPB and EAPC genes of *Cryphonectria-parasitica* encoding 2 new acid proteinases, and disruption of EAPC, *Molecular and General Genetics*, 1996, V250, N1, p97-105.

- 26- **Joe Y., Manibhushanrao K.** Biochemical constituents of differentially virulent isolates of *Sarocladium* spp. causing sheath rot disease of rice, *Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz*, 1995, vol. 102 (3), p291-298.
- 27- **Johal GS, Gray J, Gruis D, et al.** Convergent insights into mechanisms determining disease and resistance response in plant-fungal interactions, *Canadian Journal of Botany-Revue Canadienne de Botanique*, 1995, V73, S1 A-, pS468-S474.
- 28- **Kalberer P P.** Some properties of an extracellular proteolytic enzyme of *Verticillium fungicola*, a pathogen of the cultivated mushroom *Agaricus bisporus*, *Phytopathologische Zeitschrift*, 1984, 110 (3), p213-220.
- 29- **Kooman-Gersmann M, Honee G, Weide R, et al.** Molecular and biochemical basis of avirulence in the interaction between tomato and the fungal pathogen *Cladosporium fulvum*, *Mededelingen Faculteit Landbouwkundige en Toegepaste Biologische Wetenschappen Universiteit Gent*, 1996, 61 (2A), p225-229.
- 30- **Kuc J.** Production of extracellular enzymes by *Cladosporium cucumerinum*, *Phytopathology*, 1962, 52, p961-963.
- 31- **Kuc J, Williams E B.** Production of proteolytic enzymes by four pathogens of apple fruit, *Phytopathology*, 1962, 52, p961-963.
- 32- **Lambert F, Pujarnisclé S.** Purification and properties of the proteinase produced in-vitro by *Verticillium-dahliae*, *Canadian Journal of Microbiology*, 1984, 30 (12), p1488-1493.
- 33- **Lorito M, Broadway R M, Hayes C K, et al.** Proteinase inhibitors from plants as a novel class of fungicides, *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 1994, 7 (4), p525-527.
- 34- **Manjula V K, Hilda A.** Proteolytic activity of a few phytopathogenic Coelomycetes, *International Journal of Tropical Plant Diseases*, 1990, 8 (2), p231-240.

- 35- **Mc Carrol D R, Thor E.** Pectolytic cellulytic and proteolytic activities expressed by cultures of *Endothia-parasitica* and inhibition of these activities by components extracted from Chinese *Castanea-mollissima* and American chestnut *Castanea-dentata* inner bark, *Physiological Plant Pathology*, 1985, 26 (3), p367-378.
- 36- **Mc Henry J Z, Christeller J T, Slade E A, et al.** The major extracellular proteinases of the silverleaf fungus, *Chondrostereum purpureum*, are metalloproteinases, *Plant Pathology*, 1996, 45 (3), p552-563.
- 37- **Milling R J, Richardson C J.** Mode of action of the anilino-pyrimidine fungicide pyrimethanil. 2. Effects on enzyme secretion in *Botrytis cinerea*, *Pesticide Science*, 1995, 45 (1), p43-48.
- 38- **Mills J T.** Use of photographic film as a substrate for localization of protease activity by fungi on rape seeds, *Can. J. Plant Pathol.*, 1983, 5 (1), p21-24.
- 39- **Mosolov V V, Loginova M D, Fedurkina N V, et al.** The biological significance of proteinase inhibitors in plants, *Plant Science Letters*, 1976, 7, p77-80.
- 40- **Mosolov V V, Loginova M D, Malova E L, et al.** A specific inhibitor of *Colletotrichum lindemuthianum* protease from kidney bean (*Phaseolus vulgaris*) seeds, *Planta*, 1979, 144(3), p265-269.
- 41- **Movahedi S, Heale J B.** Purification and characterization of an aspartic proteinase secreted by *Botrytis cinerea* Pers ex. Pers in culture and in infected carrots, *Physiological and molecular plant pathology*, 1990, 36 (4), p289-302.
- 42- **Movahedi S, Heale J B.** The roles of aspartic proteinase and endo-pectin lyase enzymes in the primary stages of infection and pathogenesis of various host tissues by different isolates of *Botrytis cinerea* Pers ex. Pers, *Physiological and molecular plant pathology*, 1990, 36 (4), p303-324.
- 43- **Murphy J M, Walton J D.** Three extracellular proteases from *Cochliobolus carbonum*: Cloning and targeted disruption of ALP1, *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 1996, 9 (4), p290-297.

- 44- Mussel H W, Strouse B. Proteolytic enzyme production by *Verticillium albo-atrum*, *Phytopathology*, 1971, 61, p904.
- 45- North M J. Comparative biochemistry of the proteinases of eucaryotic microorganisms, *Microbiol. Rev.*, 1982, 46, p308-340.
- 46- Ode K, Funakoshi S, Murao S. Some physicochemical properties and substrate specificity of acid protease isolated from *Cladosporium* sp, *Agr. Biol. Chem.*, 1973, 37, p1723.
- 47- Peng J H, Black L L. Increased proteinase inhibitor activity in response to infection of resistant tomato plants by phytophthora-infestans, *Phytopathology*, 1976, 66 (8), p958-963.
- 48- Petaisto R-L, Rissanen T E, Harvima R J, et al. Analysis of the protein pattern of *Gremmeniella abietina* with special reference to protease activity, *Mycologia*, 1994, 86 (2), p242-249.
- 49- Pichyankura S, Beneke E S, Rogers A L. Extracellular enzymes in species of *Phialophora* *cladosporium* and *fonsecaea*, *Abstracts of the Annual Meeting of the American Society for Microbiology*, 1973, 73, p136.
- 50- Pladys D, Esquerre-Tugaye M T, Touze A. Purification and partial characterization of proteolytic enzymes in melon seedlings infected by *Colletotrichum lagenarium*, *Phytopathol.Z.*, 1981, 102 (3-4), p266-276.
- 51- Pokrovskii S N, Vinitskaya N YU, Sizova T P, et al. Action of proteinase inhibitors from buckwheat seeds on the proteolytic enzymes of the fungus, *Dokl. Biochem.*, 1982, 259 (1-6), p255-258.
- 52- Porter F M. Protease activity in diseased fruits, *Phytopathology*, 1966, 56, p1424-1425.
- 53- Rajamani S. Factors influencing the production of extracellular proteases by selected phytopathogenic fungi, *Journal of the Indian Botanical Society*, 1990, 69 (3-4), p285-287.

- 54- Rauscher M, Mendgen K, Deising H.** Extracellular proteases of the rust fungus *Uromyces viciae-fabae*, *Experimental Mycology*, 1995, 19 (1), p26-34.
- 55- Razanamparany V, Jara P, Legoux R, et al.** Cloning and mutation of the gene encoding endothiapepsin from *Cryphonectria parasitica*, *Current genetics*, 1992, 21 (6), p455-461.
- 56- Rey M E C, Noble J P.** Subcellular localization by immunocytochemistry of the extracellular protease produced by *Nectria-galligena* in infected apple tissue, *Physiological Plant Pathology*, 1984, 25 (3), p323-336.
- 57- Ries S M, Albersheim P.** Purification of a protease secreted by *Colletotrichum lindemuthianum*, *Phytopathology*, 1973, 63 (5), p625-629.
- 58- Robertsen B.** An alkaline extracellular protease produced by *Cladosporium-cucumerinum* and its possible importance in the development of scab disease of cucumber seedlings, *Physiological Plant Pathology*, 1984, 24 (1), p83-92.
- 59- Rudyuk V F, Tkachenko I F, Chernykh N A.** Inhibitors of proteolytic enzymes in plants, *Rastitel'nye Resursy*, 1975, 11 (2), p234-238.
- 60- Ryan C A.** Proteolytic enzymes and their inhibitors in plants, *Annual Review of Plant Physiology*, Vol.24, p173-196.
- 61- Ryan C A.** Protease inhibitors in plants : genes for improving defenses against insects and pathogens. *Annual Review of Phytopathology*, 1990, 28, p425-429.
- 62- Ryerson D E, Heath M C.** Fungal elicitation of wall modification in leaves of *Phaseolus-vulgaris* L. Cv. Pinto I. attempts to mimic elicitation with chemical treatments, *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 1992, 40 (4), p271-281.
- 63- Sayed F A, Abdelaleem F F, Goda S M.** Protein utilization and release of extracellular proteinase by two root-rot fungi, *Biologia Plantarum (Prague)*, 1994, 36 (4), p613-617.

- 64- **Shichi H, Uritani I.** Phytopathological chemistry of black rot sweet potato. Activity of proteolytic enzymes in diseased sweet potato, *Bull. Agric. Chem. Soc. Jap.*, 1956, 20, p211-214.
- 65- **Shishlova N P, Shishlov M P, Baturu S A, et al.** Biochemical principles of winter triticale germination and disease resistance, *Fiziologiya i Biokhimiya Kul'turnykh Rastenii*, 1997, 29 (3), p226-233.
- 66- **Somkuti G A, Babel F J.** Conditions influencing the synthesis of acid protease by *Mucor pusillus* Lindt., *Appl. Microbiol.*, 1967, 15, p1309-1312.
- 67- **Sreekantiah K R, Nagaraja Rao K S, Ramachandra Rao T N.** The production of certain extracellular hydrolytic enzymes by 4 species of plant pathogenic fungi, *Indian Journal of Microbiology*, 1972, 12 (2), p71-78.
- 68- **St Leger, R.J. Joshi, L., Roberts, D.W.** Adaptation of proteases and carbohydrases of saprophytic, phytopathogenic and entomopathogenic fungi to the requirements of their ecological niches, *Microbiology*, 1997, v. 143 (pt.6), p1983-1992.
- 69- **Staples R C, Mayer A M.** Putative virulence factors of *Botrytis cinerea* acting as a wound pathogen, *FEMS Microbiology Letters*, 1995, 134 (1), p1-7.
- 70- **Stintzi A, Heitz T, Prasad V, et al.** Plant 'pathogenesis-related' proteins and their role in defense against pathogens, *Biochimie (Paris)*, 1993, 75 (8), p687-706.
- 71- **Tiunova N A, Kobzeva N Y, Feniksova R V, et al.** Certain extracellular hydrolytic enzymes of fungi and bacteria, *Prikladnaya Biokhimiya i Mikrobiologiya*, 1973, 9 (2), p198-202.
- 72- **Urbanek H.** The role of enzymes in the interaction between higher plant and pathogen, *Wiadomosci Botaniczne*, 1987, 31 (1), p15-28.
- 73- **Urbanek H, Kuzniak E, Malolepsza U.** Enzymatic activity in broad bean leaves infected by *Botrytis fabae*, *Bulletin of the Polish Academy of Sciences. Biology*, 1987, 35 (10-12), p307-313.
- 74- **Urbanek H, Yirdaw G.** Acid proteases produced by *Fusarium* species in culture and in infected seedlings, *Physiol. Plant Pathol.*, 1978, 13, p81-87.

- 75- Urbanek H, Yirdaw G. Hydrolytic ability of acid protease of *Fusarium-culmorum* and its possible role in phytopathogenesis, *Acta Microbiologica Polonica*, 1985, 33 (2), p131-136.
- 76- Van Etten H, Bateman D F. Proteolytic activity in extracts of *Rhizoctonia*-infected hypocotyls of bean, *Phytopathology*, 1974, 64, p229-236.
- 77- Verhoeff K. The role of cell wall degrading enzymes in the pathogenesis of *Botrytis cinerea* in tomato plants, *Annals of Phytopathology*, 1978, 10, p137-144.
- 78- Wijesundera R L C, Bailey J A, Byrde R J W, et al. Cell wall degrading enzymes of *Colletotrichum lindemuthianum*: their role in the development of bean anthracnose, *Physiological and molecular plant pathology*, 1989, 34 (5), p403-413.
- 79- Yamaleev A M, Ibragimov R I. Activity of trypsin-like proteinases and their inhibitors in ripening wheat seeds infected with loose smut, *Soviet agricultural sciences*, 1986, 5, p15-18.
- 80- Yamaleev A M, Isaev R F. Change in the resistance of wheat to smuts under the action of protease inhibitors, *Sov. Agric. Sci.*, 1980, 7, p33-34.
- 81- Zalewska-Sobczak J. Sequential secretion of cell wall degrading enzymes by *Botrytis-fabae* and *Fusarium-avenaceum* during growth on host and nonhost plants, *Biochemie und Physiologie der Pflanzen (Bpp)*, 1985, 180 (3), p169-175.
- 82- Zalewska-Sobczak J, Borecka H, Urbanek H. Comparison of pectinase, xylanase and acid protease activities of virulent and less virulent isolates of *Botrytis Cinerea*, *Phytopathol. Z.*, 1981, 101 (3), p222-227.
- 83- Zhou ErXun, Wang KeRong, Lu JiaYun. Comparisons of extracellular enzyme activities and oxalate production among *Cryphonectria parasitica* isolates with different virulence levels, *Acta Mycologica Sinica*, 1996, vol. 15 (3), p182-187.

III - ARTICLES INTERNET

84- Hunter A E, Clark A J, Davies K, et al. Protease and cutinase in the pathogenic interaction between *Pyrenopeziza brassicae* and *Brassica napus*. Available from Internet <URL: <http://www.seqnet.dl.ac.uk/research/fgsc/asilomar/poster13.html>>

85- Scott-Craig J S, Pitkin J W, Appel P C, et al. Cell wall degrading enzymes of fungal plant pathogens. Available from Internet
<URL: <http://www.seqnet.dl.ac.uk/research/fgsc/asilomar/poster32.html>>

86- Templeton M D, Boxen J K, Jack S, et al. Molecular analysis of pathogenicity genes from the plant pathogenic fungus *Glomerella cingulata*. Available from Internet <URL: <http://www.seqnet.dl.ac.uk/research/fgsc/asilomar/poster32.html>>