

Effet de la Pectolyase Y-23 et de la cellulase RS sur le rendement en protoplastes viables de *Prunus cerasus* L. “Montmorency”

Raoudha Mehri-Kamoun

École supérieure d'horticulture de Chott-Meriem. 4042 Sousse (Tunisie). E-mail : raoudham@yahoo.fr

Reçu le 25 avril 2000, accepté le 23 avril 2001.

Dans le but d'isoler des protoplastes à partir de mésophylle foliaire et de calcs (de racines et de feuilles) de *Prunus cerasus* L. “Montmorency”, nous avons déterminé les combinaisons optimales d'enzymes (cellulase R-10 et cellulase RS ainsi que Pectolyase Y-23 et Macérozyme R-10) et caractérisé ces solutions en termes d'activité spécifique. L'analyse de ces activités a permis de réaliser une étude comparative sur l'isolement des protoplastes et d'établir une comparaison des différentes cellulases et pectinases employées en fonction des tissus sources de protoplastes. La caractérisation des solutions enzymatiques a été effectuée en termes d'activités FPase (activité de dégradation du papier filtre) et CMCCase (carboxyméthylcellulase) des cellulases Onozuka RS et R-10 et des activités spécifiques PME (pectine méthylestérase), PL (pectate lyase) et PG (polygalacturonase) des pectinases Macérozyme R-10 et Pectolyase Y-23. Il ressort que la digestion des tissus du mésophylle foliaire nécessite l'utilisation de la combinaison cellulase Onozuka RS et Pectolyase Y-23, tandis que les protoplastes de calcs du même matériel végétal peuvent être isolés avec une préparation de cellulase Onozuka R-10 et de Macérozyme R-10. D'autre part, l'utilisation de la cellulase Onozuka RS et de la Pectolyase Y-23 (comme pectinase) a augmenté significativement le nombre et la viabilité des protoplastes de mésophylle foliaire par rapport à l'utilisation de la cellulase Onozuka R-10 et de la Macérozyme R-10. Ces résultats sont corrélés avec l'activité spécifique de ces enzymes. Des différences significatives entre les deux pectinases sont enregistrées concernant les activités PME, PL et surtout PG et entre les deux cellulases concernant les activités FPase et surtout CMCCase. À partir de calcs, le maximum de protoplastes viables a été obtenu avec la cellulase Onozuka R-10 (faible activité CMCCase) et la Macérozyme R-10 (faible activité PG).

Mots-clés. Pectine méthylestérase (PME), pectate lyase (PL), polygalacturonase (PG), protoplaste, *Prunus*.

Effect of Pectolyase Y-23 and cellulase Onozuka RS on the yield of viable protoplasts of *Prunus cerasus* L. “Montmorency”. To isolate leaf mesophyll, leaf and root callus protoplasts of *Prunus cerasus* L. “Montmorency”, we have determined the optimum enzymatic mixtures to be used, and characterized the specific activity of these enzymes. The analysis of the specific activities of enzymes allows to compare the different cellulases and pectinases used to obtain protoplasts in relation with the tissue sources. This analysis concerned the FPase (degradation of filter paper) and CMCCase activities for cellulases Onozuka RS and R-10, and the PME (pectinmethylesterase), PL (pectate lyase) and PG (polygalacturonase) activities for the pectinases Macerozyme R-10 and Pectolyase Y-23. The results show that the digestion of leaf mesophyll tissues need cellulase Onozuka RS and Pectolyase Y-23 while callus protoplasts of the same material, can be isolated with cellulase Onozuka R-10 and Macerozyme R-10. The enzymes cellulase Onozuka RS and Pectolyase Y-23 (as pectinase) improved significantly the yield and the viability of leaf mesophyll protoplasts compared to cellulase Onozuka R-10 and Macerozyme R-10. These results were correlated to the specific activities of the enzymes. Significant differences between the 2 pectinases are observed for PME, PL and PG activities and between the 2 cellulases for CMCCase activity. From callus, the maximum amount of viable protoplasts was obtained with cellulase Onozuka R-10 (low CMCCase activity) and Macerozyme R-10 (low PG activity).

Keywords. Pectinmethylesterase (PME), pectate lyase (PL), polygalacturonase (PG), protoplasts, *Prunus*.

1. INTRODUCTION

L'obtention de protoplastes nécessite l'élimination des parois pectocellulosiques tout en préservant l'intégrité de la cellule. Cet objectif ne sera atteint qu'en optimisant le choix des enzymes et leur concentration. La paroi des cellules végétales est divisée en trois composantes structurellement et fonctionnellement indépendantes : la lamelle mitoyenne (formée principalement de pectines), la paroi primaire (formée de pectines et de celluloses) et la paroi secondaire (formée de cellulose) (Noat *et al.*, 1996). La complexité de la structure de la paroi végétale et la multiplicité des liaisons covalentes qu'il faut rompre pour libérer le protoplaste, rendent souvent difficile l'optimisation des combinaisons d'enzymes aptes à la dégrader. En général, ces enzymes sont produites par des micro-organismes (*Trichoderma viride* Pers., *Aspergillus niger* Link.) et agissent sur les différents composés de la paroi végétale (Noat *et al.*, 1996). Outre leurs activités principales (cellulases, pectinases), les préparations commerciales de ces enzymes possèdent également des activités secondaires (α -amylase, endo β -glucanase et protéase) permettant la lyse complète de la paroi cellulaire.

La plupart des préparations commerciales d'enzymes contiennent des impuretés, parfois toxiques (Chupeau, Bourgin, 1980), notamment d'autres enzymes (ribonucléases, protéases, lipases), des phénols et les sels résiduels des milieux de culture de l'organisme producteur.

La pureté des enzymes représente un facteur important à prendre en compte dans l'isolement des protoplastes pour éviter d'altérer la cellule et plus particulièrement le plasmaleme (Pilet, 1972 ; Patnaik *et al.*, 1982 ; Bengochea, Dodds, 1986) afin de maintenir la viabilité des protoplastes, leur capacité à synthétiser une paroi et à entrer en division, une fois mis sur milieu de culture approprié (Imbrie-Milligan, Hodges, 1986 ; Dugas *et al.*, 1989 ; Shea *et al.*, 1989).

Les enzymes pectolytiques utilisés se divisent en deux groupes : les enzymes déstérifiantes et les enzymes dépolymérisantes. Le premier groupe hydrolyse les liaisons ester méthyliques, il s'agit de la pectine méthylestérase (PME) qui libère du méthanol et forme des pectates. Le deuxième groupe agit par hydrolyse (acide ou enzymatique) des liaisons α -1,4 ou par des réactions de β -élimination propres aux polyuronides méthylés. Il s'agit des polygalacturonases et des pectates lyases. Ces déstérifications et dépolymérisations sont des réactions qui dépendent du pH et de la température (Thibault, 1980).

Chez *Prunus cerasus* L., la variété Montmorency s'est avérée très résistante à l'asphyxie racinaire (Boxus, communication personnelle, Gembloux). Dans le but de l'utiliser dans un programme d'hybridation somatique par fusion de protoplastes, nous avons mis au point un protocole efficace d'isolement de protoplastes à partir

de mésophylle foliaire, de cals de racines et de cals de feuilles de cette variété. Pour cela, nous avons d'une part, déterminé les combinaisons optimales d'enzymes à utiliser en fonction des tissus sources en faisant varier le type et la concentration de différentes cellulases et pectinases et d'autre part, caractérisé ces solutions en termes d'activité spécifique.

2. MATÉRIEL ET MÉTHODES

2.1. Isolement des protoplastes

Différentes combinaisons d'enzymes (cellulases et pectinases) ont été testées pour l'obtention de protoplastes à partir de mésophylle foliaire de vitroplants âgés de deux semaines et de cals issus de feuilles et de racines de *Prunus cerasus* L. "Montmorency". Toutes les enzymes sont dissoutes dans la solution saline CPW 13 % mannitol (Frearson *et al.*, 1973) additionnée de 5 mM MES, à pH = 5,6 (Kamoun, 1996).

Les résultats sont exprimés en rendement (nombre de protoplastes par g de poids frais du matériel végétal) et viabilité des protoplastes isolés. La viabilité est mesurée par coloration à la fluorescéine diacétate (FDA) à raison de 10 μ l/ml de suspension de protoplastes et examen au microscope inversé à fluorescence.

2.2. Mesure de l'activité spécifique des cellulases et des pectinases utilisées pour l'isolement des protoplastes

L'activité des préparations enzymatiques utilisées pour l'obtention de protoplastes de mésophylle foliaire ou de cals a été étudiée. L'activité cellulastique des cellulases Onozuka R-10 et RS (Yakult Pharmaceutical, Japon) a été mesurée en utilisant comme substrat du papier filtre (Whatman chromatography paper N° 3001–653) pour l'activité FPase ou de la carboxyméthylcellulose (Hoechst) pour l'activité CMCase, tandis que les activités spécifiques polygalacturonase (PG), pectate lyase (PL) et pectine méthylestérase (PME) ont été mesurées pour la Macérozyme R-10 (Yakult Pharmaceutical, Japon) et la Pectolyase Y-23 (Seishin Pharmaceutical).

Les dosages des protéines existant dans les préparations enzymatiques commerciales ont été réalisés suivant la méthode de Bradford (1976) afin de déterminer les quantités d'enzymes à mettre en jeu pour la mesure des activités spécifiques. Cette méthode consiste à mélanger 100 μ l de la solution à analyser avec 1 ml de la solution de réactif (0,01 % Bleu de Coomassie G-250 Sigma, dilué dans 47 % d'éthanol à 95 %). On ajoute ensuite 100 ml d'acide phosphorique à 85 % avant de porter à un volume final d'un litre avec l'eau distillée.

Les cellulases. L'échantillon, constitué de 500 μ l de la solution cellulase R-10 ou RS à 1 % est déposé soit sur

40 mg de papier filtre pour la FPase, soit sur 40 mg de carboxyméthylcellulose pour la CMCase. On ajoute ensuite 1 ml de tampon citrate 0,05 N (pH = 4,85). Ce mélange est incubé à 48 °C pendant 1 h. La réaction est stoppée par incubation à 100 °C pendant 20 min. Les activités FPase et CMCase sont évaluées en dosant les sucres réducteurs libérés à partir des substrats. Une unité d'activité enzymatique correspond à la quantité d'enzyme libérant 1 mg d'équivalent de glucose par mg d'enzyme et par heure (Sharrock, 1988).

Les pectinases.

Analyse de l'activité pectate lyase (PL) contenue dans la Macérozyme R-10 et la Pectolyase Y-23.

La technique de dosage de l'activité pectate lyase est basée sur le principe suivant : la pectine est dégradée sous l'action des pectate lyases par β -élimination. Cette réaction libère des composés contenant une double liaison entre C4 et C5 ; cette double liaison et le groupe carboxyle en C5 entraînent une absorbance maximale à 235 nm (Rombouts, Pilnik, 1980). L'activité PL, présente dans les enzymes Macérozyme R-10 et Pectolyase Y-23, a été mesurée par l'augmentation de l'absorbance à 235 nm selon la méthode suivante : le mélange réactionnel est constitué de 750 μ l de la solution du substrat et du même volume de la solution des différentes enzymes. La solution du substrat consiste en 0,5 % de polypectate de sodium (Sigma P 1879) dissous dans un tampon Tris-HCl 0,1 M à pH = 8,5. Les solutions enzymatiques sont obtenues en ajoutant un volume des échantillons (variant de 50 à 200 μ l selon la teneur en protéines totales) à 37,5 μ l de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ($5 \cdot 10^{-4}$ mM) ; le tout est ensuite porté à un volume de 750 μ l à l'aide du tampon Tris-HCl 0,1 M (22,4 g/l) à pH = 8,5.

Ce mélange réactionnel est ensuite incubé pendant une heure dans un bain thermostatique à 30 °C. On arrête la réaction en plongeant les échantillons dans un bain à 100 °C pendant 20 min. Après refroidissement, l'absorbance à 235 nm est mesurée dans des cuvettes en quartz. Le témoin est constitué du même échantillon ayant subi une dénaturation préalable (100 °C pendant 10 min). L'activité est exprimée en unité/ μ g de protéines. Une unité correspond à la quantité d'enzyme nécessaire à l'augmentation d'absorbance de 0,01 U/min.

Analyse de l'activité polygalacturonase (PG) contenue dans la Macérozyme R-10 et la Pectolyase Y-23.

Les polygalacturonases catalysent l'hydrolyse des liaisons glucosidiques -1,4 glycosidiques internes dans les polymères pectiques, générant des oligomères d'acide galacturonique.

Le milieu réactionnel est constitué d'un mélange de 1 ml de la solution des enzymes à analyser et de 1 ml de la solution substrat. Cette dernière est préparée

à partir de pectine NaPP (Polypectate de sodium Sigma P-1879) diluée à 0,5 % dans de l'acétate de sodium (0,1 M ; pH = 5). Ces échantillons sont incubés dans un bain-marie à 30 °C pendant 1 h. On ajoute à l'ensemble de ces échantillons 1 ml du réactif alcalin sulfate de cuivre puis on dénature les protéines à 100 °C pendant 20 min. Une fois les tubes refroidis, on ajoute alors 1 ml du réactif molybdate d'arsenic. On agite le mélange et on centrifuge à 8000 tours/min pendant 10 min pour éliminer les éléments insolubles. On attend au moins 10 min afin que la réaction soit terminée. L'absorbance est alors mesurée au spectrophotomètre à 515 nm (Cabra, 1994).

Le témoin est constitué d'un échantillon identique pour lequel l'enzyme a été préalablement dénaturée par chauffage à 100 °C pendant 10 min avant d'ajouter la solution substrat. Une unité (U) d'activité polygalacturonase est définie comme la libération de 1 μ g d'acide galacturonique par min et par ml.

Analyse de l'activité pectine méthylestérase (PME) contenue dans la Macérozyme R-10 et la Pectolyase Y-23.

La pectine méthylestérase enlève spécifiquement les groupements méthoxyles qui sont substitués sur le C6 de certains galacturonosyls. La mesure de son activité repose sur la variation du pH engendrée lors de la libération des groupements carboxyles qui provoquent une acidification du milieu, révélée par un indicateur de pH et quantifiée par spectrophotométrie. Cette acidification est mesurée par titrage en utilisant du NaOH à 0,01 M. Le substrat utilisé est la pectine estérifiée à 73 % (Fluka 76282) diluée à 1 % dans une solution NaCl à 0,15 % (pH = 7) et chauffé à 60 °C. L'indicateur de pH est le rouge de méthyle ajouté au substrat à la concentration de 5 %. On ajuste le pH de la solution à 7.

Le mélange réactionnel contient 750 μ l de substrat et 750 μ l de solution enzymatique (0,03 % Macérozyme R-10 ou 0,1 % Pectolyase Y-23) et est incubé à 35 °C dans un bain-marie pendant au moins 2 h. La lecture de l'absorbance se fait au spectrophotomètre à 520 nm. L'activité spécifique PME est exprimée en unités/mg de protéine. Une unité correspond à 10 fois le nombre de μ l de NaOH 0,01M nécessaire pour atteindre pH7 à 35 °C.

3. RÉSULTATS

3.1. Isolement de protoplastes

Dans le but d'isoler des protoplastes de mésophylle foliaire ou de cals (de feuilles ou de racines) de cerisier Montmorency, nous avons optimisé la solution enzymatique nécessaire à chaque source de tissus et caractérisé la solution optimale par l'analyse des activités spécifiques des enzymes qu'elle contient.

À partir de mésophylle de feuilles, seule la solution contenant 1 % de cellulase Onozuka R-10 et 0,1 % de Pectolyase Y-23 a permis d'isoler $6 \cdot 10^6$ protoplastes/g poids frais de feuilles et présentant une viabilité de l'ordre de 59 % (**Figure 1a**). L'augmentation ou la diminution de la concentration en cellulase R-10 ou en Pectolyase Y-23 n'a pas amélioré le rendement en protoplastes ni leur viabilité (**Figure 1a, b**). Par contre, le remplacement de la cellulase Onozuka R-10 par la cellulase Onozuka RS a permis d'accroître le rendement en protoplastes de $6 \cdot 10^6$ à $9 \cdot 10^6$ et d'augmenter leur viabilité de 59 à 79 % (**Figure 1c**). À la concentration de 1 % en cellulase R10, l'augmentation de la concentration en Pectolyase Y-23 passé 0,1 % influe négativement d'abord sur la viabilité des protoplastes puis sur leur nombre (**Figure 1b**).

L'isolement de protoplastes à partir de cals de feuilles ou de cals de racines a nécessité l'utilisation de 2 % de cellulase R-10 et 0,03 % de Macérozyme R-10 (comme pectinase). Les rendements respectifs obtenus sont $3,5 \cdot 10^6$ et $8 \cdot 10^6$ protoplastes/g de poids frais avec un taux de viabilité respectif de 86 et 91 %. Ceci s'explique par une forte séparation des agrégats cellulaires, facilitant ainsi l'accès des enzymes et se traduisant par une augmentation de la viabilité des protoplastes isolés.

Nous avons ainsi retenu la cellulase RS (1 %) et la Pectolyase Y-23 (0,1 %) pour l'isolement des protoplastes à partir de mésophylle foliaire et la cellulase R-10 (2 %) et la Macérozyme R-10 (0,03 %) pour l'isolement des protoplastes à partir de cals de racines ou de feuilles.

3.2. Détermination des activités spécifiques des cellulases et pectinases commerciales utilisées pour l'isolement des protoplastes

Une fois la solution enzymatique optimum définie pour chaque type de tissus, nous avons entrepris l'analyse des activités FPase et CMCase et des activités spécifiques PME (pectine méthylestérase), PL (pectate lyase) et PG (polygalacturonase) de ces solutions.

Le dosage de l'activité PME réalisé par la méthode spectrophotométrique (Cabra, 1994) a permis de détecter une faible activité PME dans la Pectolyase Y-23 (inférieure à 1) et une activité 10 fois plus forte dans la Macérozyme R-10. L'activité PL est très faible dans la Pectolyase Y-23 ($0,32 \pm 0,06$), et non mesurable dans la Macérozyme R-10. Par contre, l'activité PG observée est approximativement deux fois plus élevée dans la pectolyase Y-23 que dans la Macérozyme R-10 (**Tableau 1**).

L'activité cellulosique a été définie par la capacité de dégrader le papier filtre (FPase) et la carboxyméthylcellulose (CMCase). Il n'y a pas de différence significative dans l'activité FPase de la cellulase Onozuka R-10 dérivant de *Trichoderma viride* et de la cellulase Onozuka RS dérivant du mutant de *Trichoderma viride* ; par contre, l'activité CMCCase de

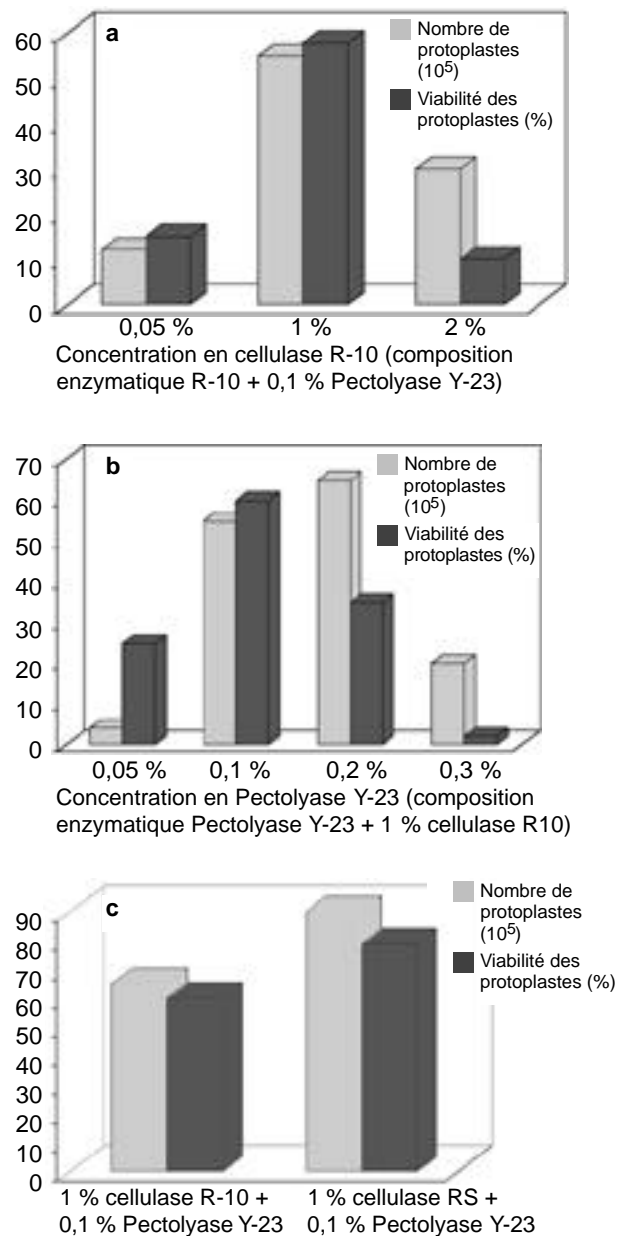


Figure 1. Effet de la concentration de la cellulase R-10 (a), de la Pectolyase Y-23 (b) et du type de cellulase R-10 ou RS (c) sur le nombre et la viabilité des protoplastes de mésophylle foliaire de *Prunus cerasus* L., cv "Montmorency" — Concentration effect of cellulase R-10 (a) and Pectolyase Y-23 (b), and effect of the type of cellulase R-10 or RS (c), on the yield and viability of mesophyll protoplasts of *Prunus cerasus* L., cv "Montmorency".

la cellulase RS est près de deux fois plus élevée que celle de la cellulase R-10 (**Tableau 2**).

4. DISCUSSION

Il ressort de ces résultats que la digestion des tissus foliaires du cerisier "Montmorency" nécessite l'utilisation

Tableau 1. Activités spécifiques polygalacturonase (PG), pectate lyase (PL) et pectine méthylestérase (PME) contenues dans la Macérozyme R-10 et la Pectolyase Y-23 — *Polygalacturonase (PG), pectate lyase (PL) and pectinmethylesterase (PME) specific activities contained in pectinases Macerozyme R-10 and Pectolyase Y-23.*

Enzymes	Activités		
	PG*	PL*	PME*
Pectolyase Y-23	10,60 ± 1,13**	0,32 ± 0,06**	0,93 ± 0,01**
Macérozyme R-10	5,32 ± 0,84**	0	9,70 ± 0,58**

* en U/mg protéine ; ** = erreur standard (3 répétitions).

Tableau 2. Activités FPase (dégradation du papier filtre) et CMCCase (dégradation de la carboxyméthylcellulose) contenues dans les cellulases Onozuka R-10 et RS — *FPase (filter paper degradation) and CMCCase (carboxymethylcellulose degradation) activities contained in cellulases Onozuka R-10 and the RS.*

Enzymes	Activités	
	FPase*	CMCase*
Cellulase R-10	2,34 ± 0,82**	0,53 ± 0,09**
Cellulase RS	2,37 ± 0,3**	0,98 ± 0,2**

* en mg équivalent glucose/mg protéine ; ** = erreur standard (3 répétitions).

en combinaison de la cellulase Onozuka RS et de la Pectolyase Y-23 alors que les protoplastes de cals (de feuilles ou de racines) peuvent être isolés avec la cellulase Onozuka R-10 et la Macérozyme R-10. D'autre part, l'utilisation de la cellulase Onozuka RS et de la Pectolyase Y-23 (comme pectinase) a augmenté significativement le nombre et la viabilité des protoplastes obtenus à partir de mésophylle foliaire par rapport à l'utilisation de la cellulase Onozuka R-10 et de la Macérozyme R-10. Ces résultats sont corrélés avec l'activité spécifique des solutions enzymatiques utilisées.

La caractérisation de la solution optimale pour chaque enzyme a été effectuée en termes d'activités spécifiques PG, PL et PME des deux pectinases (Macérozyme R-10 et Pectolyase Y-23) et d'activités FPase et CMCCase des deux cellulases (R-10 et RS) contenues dans les solutions. Ces enzymes altèrent les parois végétales en libérant des oligomères par β -élimination (PL), par hydrolyse sur des pectines faiblement méthylées (PG) ou sur des pectines estérifiées par clivage de la liaison ester du groupement méthoxyl (PME). Les préparations de cellulases contiennent divers composés agissant en synergie pour transformer la cellulose en sucres solubles et ce, par hydrolyse des liaisons β -1,4 glycosidiques.

Des différences significatives sont enregistrées entre les deux pectinases étudiées concernant leurs activités PME, PG et PL et entre les deux cellulases concernant l'activité CMCCase. La différence la plus marquée entre

les deux pectinases concerne l'activité PME, et entre les deux cellulases l'activité CMCCase. L'activité CMCCase observée dans la cellulase RS est approximativement deux fois plus élevée que celle observée dans la cellulase R-10. D'autre part, l'activité PG dans la Pectolyase Y-23 est également deux fois plus élevée que dans la Macérozyme R-10. Ceci rejoint l'idée de Johnson *et al.* (1982) qui avancent que le composé de macération de la Macérozyme R-10 isolée de *Rhizopus sp.* est une endopolygalacturonase alors que la Pectolyase Y-23 (enzyme hautement purifiée d'*Aspergillus japonicus*), contient, en plus de l'endopolygalacturonase, une endopectine lyase capable d'hydrolyser des liaisons -1,4 glycosidique de la pectine et de l'acide pectique.

D'autre part, et selon Toyama (1969), la cellulase Onozuka R-10 contient 10 unités/g d'activité de décomposition du papier filtre alors que la cellulase RS en contient 16 unités. De plus, la cellulase R-10 présente également une activité hemicellulase alors que la cellulase RS possède une activité xylanase trois fois supérieure à celle de la cellulase R-10. Ceci explique que les tissus du mésophylle foliaire nécessitent des enzymes à activité spécifique élevée par rapport aux tissus du cal, permettant ainsi d'augmenter le degré de macération et la digestion des cellules et l'obtention d'un grand nombre de protoplastes viables de mésophylle foliaire avec très peu de débris cellulaires et de cellules intactes. À partir de cals, le maximum de protoplastes viables a été obtenu avec la cellulase R-10 (faible activité CMCCase) et la Macérozyme R-10 (faible activité PG).

Il ressort également que la différence de sensibilité des parois de mésophylle foliaire ou des cals (de feuilles ou de racines) à l'action d'une enzyme peut rendre compte de la composition de la paroi comme l'ont évoqué Ochatt et Power (1990).

L'activité des enzymes a été rapportée par plusieurs auteurs comme étant un des facteurs déterminants de l'obtention des protoplastes mais aucune recherche ne s'est intéressée à la relation entre le nombre et la viabilité de protoplastes obtenus d'une part, et l'activité spécifique des enzymes de digestion de la paroi d'autre part. Les auteurs se limitent à citer l'origine (micro-organismes de purification) (Beldman *et al.*, 1985 ; Grèzes *et al.*, 1994 ; Mills, Hammerschlag, 1994) ou les valeurs théoriques indiquées par les fournisseurs (Johnson *et al.*, 1982 ; Toyama, 1969).

Un mélange d'enzymes dégradant les parois pectocellulosiques est nécessaire pour l'obtention de protoplastes viables mais l'action de ces enzymes cellulases et pectiques dépend de la structure de la paroi et est donc tributaire du tissu source, d'où l'importance des conditions de culture des tissus d'une part, et de la pureté des enzymes utilisées d'autre part.

Nous avons caractérisé la solution optimale d'enzymes en termes d'activité spécifique ; cependant ces

seules activités ne permettent pas d'expliquer entièrement l'action de ces solutions sur la macération et la digestion des parois pectocellulosiques des tissus. En effet, les activités secondaires (-amylase, protéases, etc.) et les impuretés que contiennent les enzymes commerciales (phénols, sels résiduels) peuvent également influencer l'obtention des protoplastes. D'où parfois la nécessité de recourir à la purification et/ou au dessalement des préparations enzymatiques en vue d'augmenter le rendement et surtout la viabilité des protoplastes isolés, comme le suggèrent Gonzales-Rio et Revilla (1991).

Cette étude préliminaire mérite d'être approfondie et élargie à d'autres enzymes existant dans les préparations commerciales intervenant dans la digestion de la paroi afin d'établir leur rôle dans la dégradation de la paroi cellulaire des tissus sources de protoplastes.

Remerciements

L'auteur remercie le Professeur Ph. Lepoivre (Faculté universitaire des sciences agronomiques de Gembloux) pour l'aide appréciable apportée tout le long de ce travail et M. Ph. Druart (Centre de Recherches Agronomiques de Gembloux) pour le matériel végétal.

Bibliographie

- Beldman G., Searle-Van Leewen MF., Rombouts FM., Voragen FGJ. (1985). The cellulase of *Trichoderma viride*. Purification, characterization and comparison of all detectable endoglucanase, exoglucanase and β -glucosidase. *Eur. J. Biochem.* **146**, p. 301–308.
- Bengochea T., Dodds JH. (1986). Isolation, culture and regeneration of plants. In Brammar WJ., Edidin M. (eds). *Plant protoplasts: A biotechnological tool for plant improvement*. London: Chapman & Hall, p. 1–43.
- Bradford MM. (1976). A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, p. 248–254.
- Cabra G. (1994). *Sélection et caractérisation d'un variant somaclonal de pomme de terre résistant à Erwinia carotovora subsp. atroseptica (Van Hall)*. Thèse de doctorat en sciences agronomiques, Faculté universitaire des Sciences agronomiques, Gembloux, Belgique, 121 p.
- Chupeau Y., Bourgin JP. (1980). Les protoplastes des cellules végétales. In Chaussat R., Bigot R. (eds). *Multiplication végétative des plantes supérieures*. Paris : Gauthier-Villars, p. 191–221.
- Dugas CM., Li Q., Khan IA., Nothnagel EA. (1989). Lateral diffusion in plasma membrane of maize protoplasts with implications for cell culture. *Planta* **179**, p. 387–396.
- Frearson EM., Power JB., Cocking EC. (1973). The isolation, culture and regeneration of *Petunia* leaf protoplasts. *Dev. Biol.* **33**, p. 130–137.
- Gonzales-Rio T., Revilla MA. (1991). Evaluation of parameters affecting yield viability and cell division of Actinidiaceae protoplasts. 8th International protoplast symposium. *Physiol. Plant.* **82** (1), p. A 85.
- Grezes J., Thomas D., Thomasset B. (1994). Factors influencing protoplast isolation from *Coffea arabica* cells. *Plant Cell, Tissue Organ Cult.* **36**, p. 91–97.
- Imbrie-Milligan C., Hodges TK. (1986). Microcallus formation from Maize protoplasts prepared from embryogenic callus. *Planta* **168**, p. 395–401.
- Johnson LB., Stuteville DL., Higgins RK., Douglas HL. (1982). Pectolyase Y-23 for isolating mesophyll protoplasts from several *Medicago* species. *Plant Sci. Lett.* **26**, p. 133–137.
- Kamoun R. (1996). *Culture de protoplastes et contaminants procaryotiques de Prunus cerasus L. "Montmorency"*. Thèse de doctorat en sciences agronomiques, Faculté universitaire des Sciences agronomiques, Gembloux, Belgique, 150 p.
- Mills D., Hammerschlag FA. (1994). Isolation of cells and protoplasts from leaves of *in vitro* propagated peach (*Prunus persica*) plants. *Plant Cell, Tissue Organ Cult.* **36**, p. 99–105.
- Noat G., Nari J., Moustakas AM., Borel M. (1996). Propriétés des parois cellulaires végétales et interaction matrice-enzymes. *Bull. Soc. Bot. Fr. Actual. Bot.* **138**, (3/4), p. 263–277.
- Ochatt SJ., Power JB. (1992). Plant regeneration from cultured protoplasts of higher plants. In *Plant biotechnology. Comprehensive Biotechnology*. 2nd suppl., p. 99–127
- Patnaik G., Wilson D., Cocking EC. (1982). Importance of enzyme purification for increasing plating efficiency and plant regeneration from single protoplasts of *Petunia purrodii*. *Z Pflanzenphysiol.* **102**, p. 199–205.
- Pilet PE. (1972). Transaminase activities of root protoplasts. *Experientia* **28**, p. 638–639.
- Rombouts FM., Pilnik W. (1980). Pectic enzymes. In Rose Att. *Economic Microbiology 5, microbiology enzymes and bioconversions*. London: Academic Press, p. 227–282.
- Sharrock KR. (1988). Cellulase assay methods: a review. *J. Biochem. Biophys. Methods* **17**, p. 81–106.
- Shea EM., Gibeau DM., Carpitan C. (1989). Structural analysis of the cell walls regenerated by carrot protoplasts. *Planta* **179**, p. 293–308.
- Thibault JF. (1980). Les substances pectiques. In Monties B. (éd.) *Les polymères végétaux, polymères pariétaux et alimentaires non azotés*, p 233–251. Paris : Gauthier-Villars (éd.).
- Toyama N. (1969). Applications of cellulases in Japan. In American Chemical Society (ed.). *Cellulases and their applications symposium. 156th meeting of the American Chemical Society. Atlantic City, N.J., Sept. 11–12 1968*, p. 359–390.

(22 réf.)