

## ACTION DE MOLECULES A PROPRIETES HORMONALES SUR L'ACTIVITE PHENYLALANINE AMMONIAC LYASE

J. C. VALLEE, M. PAYNOT, C. MARTIN, G. VANSUYT et J. PREVOST

Station de Physiopathologie Végétale, INRA, BV 1540 21034 Dijon cedex, France

(Received 7 February 1975)

**Key Word Index**—*Nicotiana tabacum*; Solanaceae; *Triticum aestivum*; Gramineae, phenylalanine ammonia lyase; herbicides; piclorame; atrazine; methylchloro-phenoxyacetic acid.

**Abstract**—A comparative study has been made of phenylalanine ammonia lyase (PAL) activity in plants sensitive or resistant to various herbicides (piclorame, methylchloro-phenoxyacetic acid (MCPA), atrazine). Piclorame, a herbicide with hormonal activity caused a large decrease in PAL activity of sensitive plants (*Nicotiana tabacum*), even at low concentrations ( $5 \times 10^{-9}$  M) whilst in resistant plants (*Triticum aestivum*) its effect is negligible; MCPA, also a herbicide with hormonal activity, similarly affects the activity of PAL, but only at higher concentrations. On the contrary, the action of atrazine, which has no hormonal activity, is lower and weaker, probably being only a secondary effect. Determinations of PAL activity during the photoperiod following piclorame application indicate that this herbicide influences principally the photodependent enzyme activity.

### INTRODUCTION

Parmi les nombreux travaux effectués à ce jour sur le mode d'action des herbicides, beaucoup portent sur la photosynthèse, c'est-à-dire sur un mécanisme spécifique des végétaux. Or il existe d'autres processus biochimiques, propres aux plantes dont l'étude mériterait d'être approfondie après action d'une molécule herbicide ou hormonale: la synthèse des vitamines ou celle des composés aromatiques par exemple ... Dans ce cadre, il est apparu intéressant d'étudier l'action de divers herbicides sur une enzyme clef du métabolisme des substances aromatiques, la phénylalanine ammoniac lyase (PAL), enzyme responsable de la transformation de la phénylalanine en acide cinnamique, (E.C. 4.3.1.5.) [1] Le but de cet article est de donner les premiers résultats concernant l'action de deux molécules à propriétés hormonales, le piclorame et le MCPA ainsi que de l'atrazine sur l'activité PAL de plantes dites "sensibles et résistantes".

### RESULTATS

#### Influence de la concentration en substance active

Compte-tenu des variations d'activité PAL au cours de la période lumineuse, mises en évidence

chez le tabac [2], les applications de substances actives sont faites à des temps permettant d'effectuer les prélèvements pour mesure 5-6 hr après le début de la photopériode, c'est-à-dire au maximum d'activité quand les plantes sont élevées à 20°.

Les essais avec le piclorame sur tabacs sont divisés en deux groupes: on a d'une part, les expériences avec des concentrations provoquant la mort des plantes, à savoir de  $5 \times 10^{-4}$  M à  $5 \times 10^{-6}$  M, d'autre part les expériences avec des doses faibles, à partir de  $5 \times 10^{-7}$  M et en dessous.

A doses élevées (Fig. 1a), le piclorame provoque une diminution très importante de l'activité PAL des tissus analysés 24 hr après son application; cette baisse d'activité est encore plus prononcée 48 hr après; en effet, la quantité d'acide cinnamique formé par heure et par gramme de poids frais passe de 15,6  $\mu$ g dans la plante témoin à moins de 3  $\mu$ g pour des concentrations comprises entre  $5 \times 10^{-4}$  M et  $5 \times 10^{-6}$  M (Fig. 1b). A partir de  $5 \times 10^{-7}$  M (Fig. 1) on a encore baisse de l'activité mais dans des proportions plus faibles. En dessous, il faut attendre 3-4 jours pour détecter une différence significative entre plantes témoins

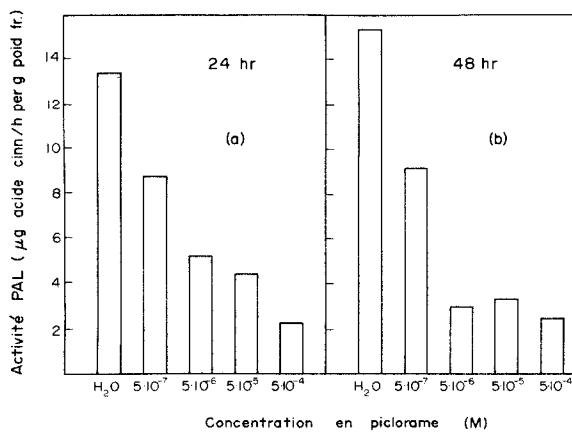


Fig. 1. Activité phenyl-alanine ammoniac lyase de sommets de *Nicotiana tabacum* var. Xanthi n.c. traités avec différentes concentrations en piclorame. (a) 24 hr après traitement; (b) 48 hr après traitement.

et traitées à  $5 \times 10^{-8}$  M et une dizaine de jours pour celles qui ont reçu 100 ml de  $5 \times 10^{-9}$  M (Fig. 2).

Le piclorame provoque donc, même à des concentrations très faibles, une diminution de l'activité phénylalanine ammoniac lyase des tissus de *Nicotiana tabacum*. Deux questions se posent à la suite de cette première expérience : ce résultat est-il spécifique du piclorame? Le piclorame agit-il d'une manière semblable sur des plantes résistantes?

Avec le MCPA (Fig. 3a), les résultats sont de même nature : l'activité PAL est abaissée 24 hr après un traitement à  $5 \times 10^{-4}$  M. A  $5 \times 10^{-5}$  M et  $5 \times 10^{-6}$  M, il faut 48 hr pour déceler une diminution d'activité enzymatique. Le MCPA,

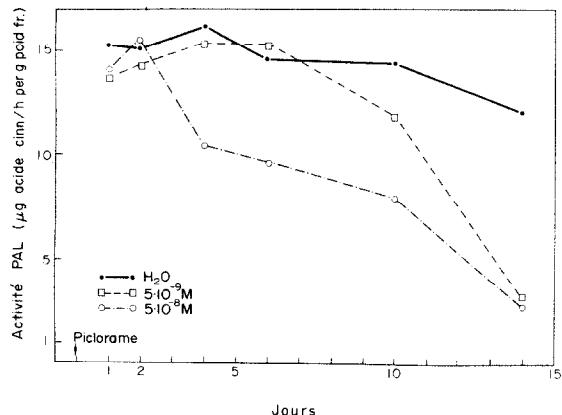


Fig. 2. Evolution de l'activité phenyl-alanine ammoniac lyase de sommets de *Nicotiana tabacum* var. Xanthi n.c. à la suite d'un traitement avec de faibles concentrations en piclorame.

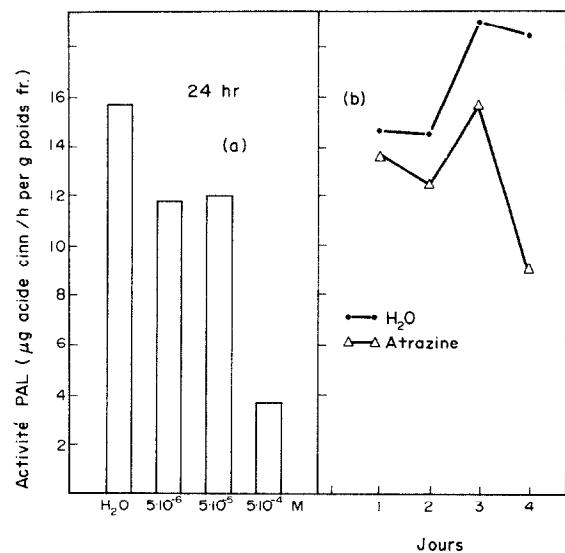


Fig. 3. (a) Activité phenyl-alanine ammoniac lyase de sommets de *Nicotiana tabacum* var. Xanthi n.c. 24 hr après un traitement au MCPA à diverses concentrations. (b) Evolution de l'activité phenyl-alanine ammoniac lyase de sommets de *Nicotiana tabacum* var. Xanthi n.c. à la suite d'un traitement à l'atrazine ( $5 \times 10^{-5}$  M).

hormone de synthèse, est 100–1000 fois moins actif que le piclorame.

Les tabacs traités à l'atrazine réagissent un peu moins rapidement. En raison de la très faible solubilité dans l'eau de cette substance, il n'a pas été possible de faire des essais à  $5 \times 10^{-4}$  M. Cependant, même à  $5 \times 10^{-5}$  M, il faut attendre plusieurs jours pour détecter une différence significative par rapport aux plantes non traitées (Fig. 3b).

Les essais réalisés sur *Triticum aestivum* conduisent à des résultats tout-à-fait différents. L'activité PAL de blé est beaucoup plus importante que celle des tabacs : chez *Nicotiana tabacum* var. Xanthi n.c., 15–18 μg d'acide cinnamique sont formés par heure et par gramme de poids frais; chez le blé plus de 40 μg sont produits dans les mêmes conditions. En outre, le piclorame à  $5 \times 10^{-4}$  M (Fig. 4) provoque une diminution de l'activité PAL, mais seulement plusieurs jours après le traitement, entre 6 et 10 jours avec la variété Champlain et 4 à 6 jours avec la variété Kolibri. Mieux, on observe une augmentation d'activité les premiers jours suivant l'application.

A des concentrations inférieures,  $5 \times 10^{-5}$  M par exemple (Fig. 5), il n'est plus possible de déceler des variations de l'activité PAL entre blé

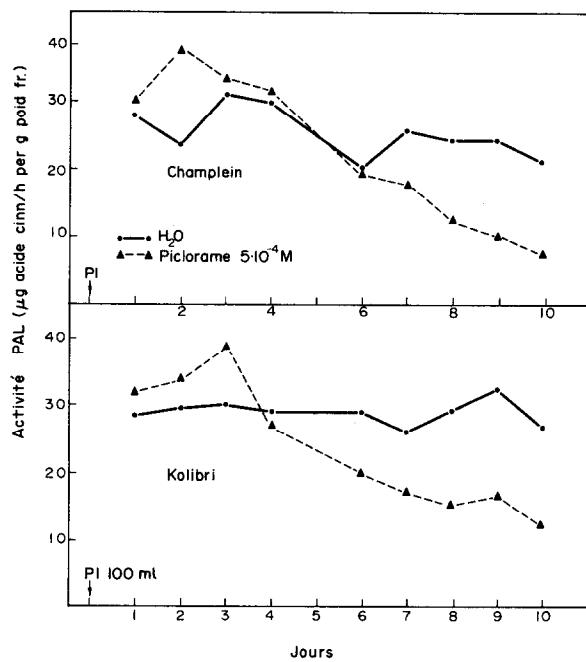


Fig. 4. Evolution de l'activité phenyl-alanine ammoniac lyase des plantules de *Triticum aestivum* var. Champlain ou Kolibri, à la suite d'un traitement au piclorame ( $5 \times 10^{-4} \text{ M}$ ).

témoin et traité, si ce n'est une légère augmentation dans les plantes ayant reçu le piclorame.

Par contre, à l'inverse, l'atrazine à  $5 \times 10^{-5} \text{ M}$  abaisse l'activité PAL entre le 3ème et le 6ème jour suivant le traitement. Cependant, bien que ce changement d'activité soit important, il ne se produit pas avant plusieurs jours; le mode d'action de l'atrazine est donc différent de celui du piclorame.

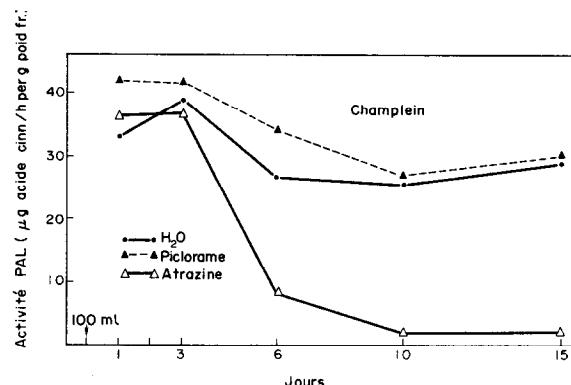


Fig. 5. Evolution de l'activité phenyl-alanine ammoniac lyase de plantules de *Triticum aestivum* var. Champlain suivant un traitement au piclorame ou à l'atrazine ( $5 \times 10^{-5} \text{ M}$ ).

Les modifications d'activité de la phénylalanine ammoniac lyase après application d'une substance à caractère herbicide semblent différentes selon les plantes, mais aussi selon le type d'herbicide employé. A la suite de ces premières observations et compte tenu des variations de l'activité PAL au cours de la photopériode chez le tabac [2], il paraît important d'analyser comparativement les variations d'activité PAL de plantes traitées et non traitées au cours d'une période lumineuse; il est également important de déterminer, au cours d'un cycle de 24 hr, le moment de traitement le plus favorable à la mise en évidence d'une altération profonde de l'activité enzymatique.

#### *Variations au cours de la photopériode; influence du moment de traitement*

Des *Nicotiana tabacum* var. Xanthi n.c., à 20°, sont arrosés avec 100 ml d'une solution de piclorame (les résultats sont semblables avec  $5 \times 10^{-4} \text{ M}$ ,  $5 \times 10^{-5} \text{ M}$  ou  $5 \times 10^{-6} \text{ M}$ ), 18 hr, 8 ou 3 hr avant le début de la période lumineuse. A partir du temps zéro (allumage de la salle climatisée), on prélève à intervalles réguliers les tissus pour analyse.

Dans les plantes témoins (Fig. 6), l'activité PAL, faible au cours de la nuit et en début de journée s'accroît progressivement pour atteindre un maximum vers la 5ème ou la 6ème heure, puis diminue ensuite pour conserver une valeur faible jusqu'au début de la photopériode suivante.

Si les plantes reçoivent le piclorame 3 heures avant le début de la photopériode, elles ne présentent pas de différence d'activité par rapport aux témoins; on retrouve effectivement la même augmentation d'activité PAL dans les premières heures puis sa diminution au delà de la 6ème heure.

Par contre, si le traitement est fait 18 hr et même seulement 8 hr avant, c'est-à-dire comme le montre la Fig. 6 juste au début de la période obscure, l'activité PAL est considérablement abaissée; en fait, dans ces conditions, on ne peut plus déceler de variations de l'activité enzymatique au cours de la journée; elle reste à un niveau faible et relativement constant.

Si on recherche le temps minimum de traitement nécessaire pour déclencher une inhibition d'activité au cours de la photopériode suivante,

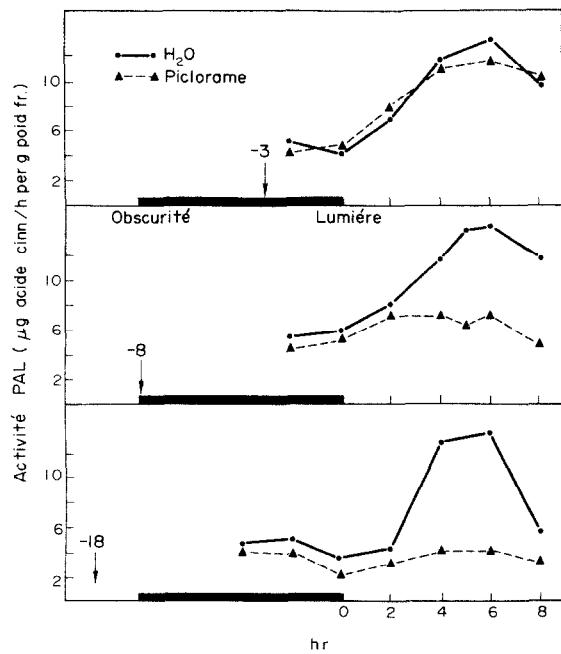


Fig. 6. Evolution de l'activité phenyl-alanine ammoniac lyase de sommets de *Nicotiana tabacum* var. Xanthi n.c., au cours de la photopériode suivant un traitement au piclorame. (→ Moment du traitement).

on remarque qu'il suffit d'appliquer le piclorame au moins 6 à 7 hr avant le début de la phase lumineuse pour mettre en évidence ce phénomène.

#### DISCUSSION

Si la réaction ou la sensibilité des blés à la présence de certains herbicides à propriétés hormonales est différente de celle des tabacs, il en est de même de leur activité phénylalanine ammoniac lyase respective.

En effet, chez le blé, la synthèse de l'acide cinnamique à partir de la L phénylalanine n'est pas modifiée par un traitement au piclorame (sauf à des doses très élevées) alors que cette synthèse est profondément perturbée chez le tabac; il en est de même avec le MCPA, c'est-à-dire avec une autre substance à activité hormonale. Par contre, avec l'atrazine, les résultats sont moins clairs; l'atrazine diminue l'activité phenyl-alanine ammoniac lyase des tissus de blé et de tabac, mais son action semble plus tardive et moins brutale; elle ressemble plus à un phénomène secondaire. D'autres expériences sont indispensables pour le vérifier.

Quoiqu'il en soit, il existe une certaine corrélation entre "résistance ou sensibilité" à certaines molécules herbicides et variations de l'activité PAL. Etant donné l'importance de cette enzyme dans le métabolisme des composés phénoliques chez les végétaux, cette observation nous apparaît fondamentale. Comment peut-on expliquer de tels changements d'activité?

La diminution de synthèse de l'acide cinnamique peut être due: soit à un ralentissement ou à un arrêt de synthèse protéique ou plus spécifiquement à une inhibition de synthèse de la phénylalanine ammoniac lyase seule:

soit à une inactivation de l'enzyme par action directe de l'herbicide ou d'un composé issu d'une déviation métabolique induite par la substance active.

Selon Moreland *et al.* [3] il n'y a pas de différence d'intégration de la leucine  $^{14}\text{C}$  dans les protéines de plantes traitées au piclorame et celle de plantes témoins. Vallee (résultats non publiés) a mis en évidence, dans certaines conditions, des changements d'incorporation de la proline  $^{14}\text{C}$  dans les protéines de tabac après un traitement au piclorame; cependant, ces résultats ne semblent pas pouvoir expliquer, à eux seuls, les importantes variations de l'activité PAL à moins d'une action spécifique sur cette enzyme; on peut rejeter cette hypothèse car nous avons vérifié que le piclorame n'a aucune action *in vitro* sur l'activité de la PAL.

De plus, la phenylalanine ammoniac lyase est une enzyme dont la synthèse [4-6] est sous la dépendance de la lumière. Les résultats obtenus sur *Nicotiana tabacum* permettent de supposer que le piclorame et d'autres substances de même nature perturbent les mécanismes associés à cette photodépendance; en effet, c'est l'augmentation de l'activité PAL liée à la photopériode qui n'a plus lieu quand on applique l'herbicide.

Il faudra s'attacher à répondre à ces diverses questions, car de tels travaux pourraient permettre d'orienter les recherches de nouvelles molécules à activité herbicide.

#### PARTIE EXPERIMENTALE

*Le matériel végétal.* Les *Nicotiana tabacum* var. Xanthi n.c., ainsi que les blés *Triticum aestivum* var. Champlain ou Kolibri (quelques essais ont été faits avec Rex ou Joss), utilisés pour

ces expériences, sont élevés sur un mélange tourbe-gravier; ils reçoivent chaque jour une solution nutritive [7]. Les plantes sont placées en salle climatisée à 20°, sous un éclairage de 12000 lux, une photopériode de 16 hr et une humidité relative de 70%. Les déterminations d'activité enzymatique sont effectuées, pour le tabac, au stade végétatif (45-60 jours après le semis dans les conditions ci-dessus décrites), sur le sommet de la plante comprenant l'apex, les jeunes feuilles, une feuille ayant terminé sa croissance et la tige correspondante. Pour les blés, les expériences sont faites sur l'ensemble des parties aériennes, au stade de deux feuilles.

**Herbicides utilisés.** Les traitements se font par arrosage des plantes avec 100 ml de la solution d'herbicide. C'est le piclorame ou acide 4 amino 3,5,6 trichloropicolinique qui a été le centre d'intérêt de cette étude; mais afin de vérifier la spécificité des résultats obtenus, deux autres composés ont également été employés: l'acide méthyl chloro phenoxy acétique (MCPA) qui agit comme le piclorame telle une hormone et, une triazine, la 2 chloro, 4,ethylamino-6-isopropylamino-s-triazine ou atrazine, composé de nature et d'action différentes.

*Le piclorame* son action sur tabac a déjà été décrite par d'autres auteurs [8-9]; *Nicotiana tabacum* est une plante très sensible à ce composé; 24 hr après application de solutions à  $5 \times 10^{-4}$  M,  $5 \times 10^{-5}$  M ou  $5 \times 10^{-6}$  M, les tabacs présentent déjà de profondes anomalies au niveau des feuilles en croissance; les plantes meurent au bout de 6 à 8 jours. Avec des applications de  $5 \times 10^{-7}$  M à  $5 \times 10^{-10}$  M, les symptômes apparaissent plus lentement et ne sont plus fatals; en outre, leur violence dépend du stade de développement de la plante: en effet, *Nicotiana tabacum* var. Xanthi n.c. manifeste un surcroit de sensibilité au piclorame au moment de l'induction florale. Entre  $5 \times 10^{-7}$  M et  $5 \times 10^{-8}$  M, on observe de sévères déformations foliaires accompagnées de proliférations cellulaires anarchiques le long de la tige ou des pétioles. Au-delà de ces doses, la présence de piclorame ne se manifeste plus que par de légères déformations des feuilles avec un allongement de l'extrémité libre du limbe. Des expériences récentes (qui demandent encore à être approfondies) tendent à montrer qu'un dépôt de quelques dizaines de microlitres de la solution à  $5 \times 10^{-4}$  M sur une feuille adulte provoque après 24 ou 48 hr des symptômes de même ordre que les 100 ml de cette même solution fournie par arrosage.

Toutes les variétés de *Triticum aestivum* utilisées (plantes dites résistantes à cet herbicide) présentent une réaction à  $5 \times 10^{-4}$  M, mais les symptômes sont plus violents sur Kolibri; courbure au niveau de collet et nécroses après 6 à 8 jours. A  $5 \times 10^{-4}$  M, on a encore sur la variété Kolibri, quelques nécroses; sur Champlein, on observe un ralentissement de la croissance suivi d'une légère courbure des collets au bout de 8 à 10 jours. Pour des doses inférieures, en dehors d'une diminution de croissance, on n'observe plus de différence avec les plantes témoins.

*L'acide méthyl-chloro phenoxy acétique (MCPA)* provoque à  $5 \times 10^{-4}$  M la mort de *Nicotiana tabacum*, 7-10 jours après le traitement. En deçà, à  $5 \times 10^{-5}$  M, on observe rapidement des symptômes voisins de ceux du piclorame utilisé à  $5 \times 10^{-7}$  M ou  $5 \times 10^{-8}$  M. Avec des concentrations inférieures, le MCPA ralentit la croissance.

*L'atrazine* l'action de cette molécule est différente: elle n'est pas de nature hormonale; on sait que son site d'action est le chloroplaste; cette molécule agirait comme inhibiteur du photo système II de la photosynthèse [10]. Dans les conditions ambiantes utilisées, l'atrazine provoque, chez *Nicotiana tabacum*, l'apparition de chloroses 5 à 7 jours après un traitement à  $5 \times 10^{-5}$  M. Sur *Triticum aestivum* et spécialement sur la variété Champlein, on observe aussi l'apparition de taches chlorotiques suivies de petites nécroses.

*Extraction de l'enzyme, mesure de son activité.* Les tissus, après pesée, sont broyés à 2°, dans un tampon borate 0.1 M, pH 8, 8 à raison de 2 ml par gramme de poids frais en présence de charbon végétal à raison de 100 mg par gramme de tissu frais; on centrifuge durant 30 mn à 48000 g. L'activité PAL est déterminée sur le surnageant [11]. *Mélange réactionnel.* Dans les cuves (3 ml) d'un spectrophotomètre (Beckman Acta III) maintenues à 30°, on place: tampon borate (0,14 mM), l'extrait enzymatique (1 ml) et la L phénylalanine (0,03 mM). Dans la cuve référence, le substrat est remplacé par du tampon borate. On mesure la variation de densité optique à 290 nm correspondant à la transformation de la L phénylalanine en acide cinnamique. Les résultats sont exprimés en microgrammes d'acide cinnamique formé par gramme de poids frais et par unité de temps. Toutes les expériences sont effectuées au minimum deux fois.

## REFERENCES

1. Koukol, J. et Conn, E. E. (1961) *J. Biol. Chem.* **236**, 2692.
2. Paynot, M., Martin, C. et Giraud, M. *C.R. Acad. Sci. (Paris) Sér. D.* **277**, 1713 (1973).
3. Moreland, D. E., Malhotra, S. S., Gruenhagen, R. D. et Shokrai, E. H. (1969) *Weed. Sci.* **17**, 556.
4. Zucker, M. (1965) *Plant Physiol.* **40**, 779.
5. Mohr, H. (1966) *Photochem. Photobiol.* **5**, 469.
6. Engelsma, G. (1967) *Planta (Berlin)* **75**, 207.
7. Coic, Y. et Lesaint, C. (1973) *Rev. Horticole* **2316**, 23.
8. Klingman, G. C. et Guédéz, H. (1967) *Weeds* **15**, 142.
9. Mounat, A., Schiltz, P. et Cazamajour, F. (1969) *Phytiatr. Phytopharm.* **18**, 155.
10. Ashton, F. M. et Crafts, A. S. (1973) dans *Mode of Action of Herbicides*, Wiley-Interscience, New York.
11. Rissland, I. et Mohr, H. (1967) *Planta (Berlin)* **77**, 239.