

INFLUENCE DU PICLORAME SUR L'ACTIVITÉ PHÉNYLALANINE-AMMONIAC LYASE DE NICOTIANA TABACUM INDUITE PAR LA RÉACTION D'HYPERSENSIBILITÉ AU VIRUS DE LA MOSAÏQUE DU TABAC

M. PAYNOT, J. C. VALLEE, C. MARTIN, G. VANSUYT et F. JAVELLE
I.N.R.A., Station de Physiopathologie Végétale, B.V. 1540, 21034 Dijon-Cedex, France

(Revised received 5 November 1975)

Key Word Index—*Nicotiana tabacum*; Solanaceae; tobacco mosaic virus; hypersensitivity reaction; phenylalanine ammonia lyase; piclorame; 4-amino-3,5,6-trichloropicolinic acid.

Abstract—In *Nicotiana tabacum* var. Xanthi n.c. phenylalanine ammonia lyase (PAL) activity, which increases significantly during the hypersensitivity reaction to tobacco mosaic virus (TMV), is only partially affected when plants are treated with piclorame, which is known to be an inhibitor of PAL *in vivo*. Using piclorame together with TMV, it has been possible to distinguish between that increase in PAL activity due to the virus and that dependent on the photoperiod.

INTRODUCTION

Chez les tabacs porteurs du gène N, *Nicotiana tabacum* var. Xanthi n.c. par exemple, l'hypersensibilité au virus de la mosaïque du tabac (V.M.T.) se manifeste à 20° par l'apparition de lésions locales nécrotiques autour du point de pénétration du virus [1]; dans ces conditions, la multiplication du virus s'arrête et le reste de la plante demeure indemne. A 32°, la réaction hypersensible n'a plus lieu [2]: le virus se multiplie abondamment dans tous les tissus de la plante hôte, comme il le fait chez des tabacs sensibles qui, porteurs du gène "récessif n" sont envahis d'une façon systémique à toutes températures comprises entre 15 et 34-35°. Par contre, des *N. tabacum* var. Xanthi n.c. inoculés à 32° présentent après transfert à 20° des nécroses dans tous les tissus où le virus est en voie de multiplication [3]; ainsi sur des tabacs inoculés à 32° depuis 72 hr, les feuilles du sommet, en cours d'envahissement par le virus, se nécrosent complètement 6 à 8 hr après le retour à 20°. Le déclenchement de la réaction d'hypersensibilité à 20° est accompagné d'une accumulation de nombreux composés phénoliques alors qu'aucun changement semblable ne se produit à 32° [4].

On a également montré, dans les conditions d'expression du gène N d'hypersensibilité, c'est-à-dire entre 15 et 26-27°, une augmentation considérable de l'activité de la phénylalanine ammoniac lyase-PAL- (E.C.4.3.1.5.), concomitante de l'apparition des lésions locales [5]. A une température permanente de 32°, à laquelle les plantes porteuses du gène N se comportent comme des hôtes sensibles, l'activité PAL des plantes malades est toujours inférieure à celle des plantes saines [6]. Enfin, chez des tabacs inoculés à 32° depuis 72 hr, puis transferés à 20°, une augmentation importante de l'activité de la PAL, enzyme clé [7] de la synthèse des composés phénoliques, précède de plusieurs heures l'apparition des nécroses [8].

Certaines substances à propriétés hormonales provoquent des perturbations importantes de l'activité PAL et ont plus spécialement une action sur la photodépendance de l'enzyme [9]; de plus, la multiplication d'un virus perturbant souvent gravement le métabolisme hormonal du végétal parasité, il est apparu intéressant de comparer l'activité enzymatique de plantes saines et malades traitées ou non par certaines de ces molécules. Le but de cette article est de relater l'influence du piclorame (acide amino-4 trichloro-3,5,6 picolinique) sur l'activité phénylalanine ammoniac lyase de tabacs hypersensibles sains et virosés.

RESULTATS

Les expériences sont réalisées avec une concentration de piclorame de $5 \times 10^{-4} M$. Si on examine la figure n° 1 on observe que l'activité PAL des plantes saines, faible au cours de la période obscure et au début de la photopériode, augmente progressivement pour atteindre un maximum entre la cinquième et la huitième heure de lumière; la quantité d'acide cinnamique formée *in vitro* passe de 4,5 µg par g de poids frais, au début de la photopériode, à 15 µg à la 7 ème heure; par la suite, l'activité décroît. Les plantes saines traitées au piclorame à $5 \times 10^{-4} M$ montrent une activité PAL faible et constante quelle que soit l'heure de la journée. En effet, cette substance inhibe moins de 12 hr après son application l'activité de la phénylalanine ammoniac lyase photodépendante: à aucun moment de la photopériode la quantité d'acide cinnamique produit *in vitro* ne dépasse 6 µg par unité de poids frais.

Si on examine, à présent, les résultats des mesures effectuées sur les plantes malades non traitées, on remarque que l'activité PAL est plus faible que celle des témoins sains au moment du transfert à 20°. Mais elle s'accroît ensuite très rapidement après 3 ou 4 hr de séjour

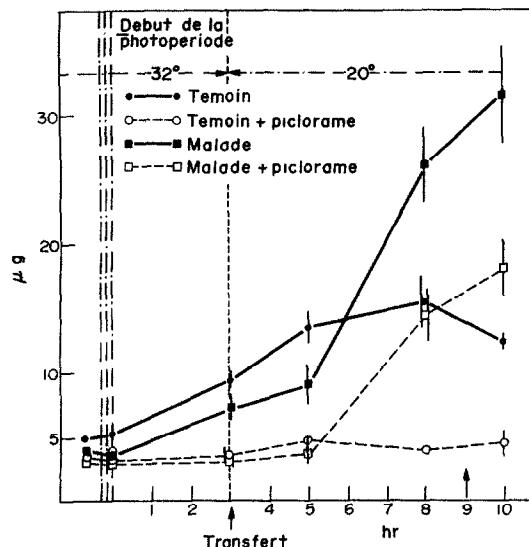


Fig. 1. Activité PAL (en μg d'acide cinnamique formé par hr et par g de poids frais) de sommets de *Nicotiana tabacum* var. Xanthi n.c. sains ou malades, traités ou non avec le piclorame à $5 \times 10^{-5}\text{M}$. La flèche indique l'apparition des nécroses sur les plantes malades. Le pourcentage de variation de part et d'autre de la valeur moyenne est indiqué.

à cette température, jusqu'à dépasser ensuite celle des témoins; cet accroissement d'activité se manifeste avant l'apparition des nécroses qui sont visibles macroscopiquement, dans ces expériences, entre la 6 ème et la 7 ème hr suivant le transfert.

Les mesures d'activité PAL des plantes malades traitées au piclorame fournissent un résultat intéressant; en effet, alors que le piclorame inhibe fortement l'activité enzymatique liée à la photopériode, son influence relative sur l'importante augmentation d'activité de l'enzyme,

associée à la réaction hypersensible, est plus faible; la quantité d'acide cinnamique produit par les extraits de plantes malades traitées par une solution de piclorame à $5 \times 10^{-4}\text{M}$ s'élève encore à $19 \mu\text{g}$ par g de poids frais. Toutefois, les différences respectives entre témoins traités et non traités d'une part, entre plantes malades traitées et non traitées d'autre part, sont du même ordre de grandeur dans les divers cas. Le piclorame a donc le même effet en valeur absolue.

En outre, les augmentations d'activité PAL des plantes malades et malades traitées au piclorame sont identiques quand le transfert de 32° à 20° est effectué à la fin de la période lumineuse, comme le montre la Fig. 2. Cependant, les symptômes dus à l'application de la molécule à propriété herbicide sont plus marqués à la 6 ème hr sur les plantes à l'obscurité que sur les plantes restées à la lumière. À la 7 ème heure et à l'obscurité la lyse tissulaire est telle que des prélevements en vue de doser l'activité enzymatique n'avaient plus aucune signification biologique.

DISCUSSION-CONCLUSION

Les principaux résultats de ces expériences peuvent être résumés ainsi: les variations de l'activité phénylalanine ammoniac lyase associées à la photopériode sont inhibées par un traitement au piclorame chez les plantes saines; par contre, l'importante augmentation de l'activité de la PAL qui précède l'apparition des nécroses, au cours de la réaction d'hypersensibilité au virus de la mosaïque du tabac, n'est pas ou est plus faiblement influencée, en valeur relative du moins, par l'application de cette molécule.

Certains auteurs [10-12] pensent que la synthèse de la PAL est photodépendante; en effet, alors qu'on n'observe qu'une faible activité à l'obscurité, on note une augmentation rapide de l'activité de l'enzyme dans les heures qui suivent le passage à la lumière; par la suite cette activité passe par un maximum et diminue, vraisemblablement grâce à l'action de certains inhibiteurs. On peut également supposer que l'augmentation d'activité provoquée par la lumière n'est pas due à une synthèse de PAL, mais à une activation photo-ou phytochrome dépendante de cette enzyme, suivie d'une inhibition encore mal définie. Quoiqu'il en soit, nos essais montrent que le piclorame inhibe, soit la synthèse, soit l'activation de l'enzyme de plantes saines et, par voie de conséquence, les plantes révèlent une activité faible et constante tout au long de la journée.

Quant aux plantes malades, on supposait déjà que l'importante augmentation de l'activité de l'enzyme précédant l'apparition des nécroses après retour à 20° n'était pas dépendante de la lumière: même pendant la période obscure, cette augmentation se produit au cours de la réaction hypersensible.

Les expériences relatées ici fournissent une autre démonstration de cette photoindépendance. En effet, malgré la présence du piclorame qui inhibe l'activité PAL normale des plantes saines, on observe chez les plantes malades traitées une augmentation de la quantité d'acide cinnamique produit *in vitro* à la lumière comme à l'obscurité. Ceci indique que les variations d'activité PAL dues au virus sont différentes de celles induites par la lumière. Le virus d'une part, la lumière d'autre part, agissent vraisemblablement sur deux mécanismes partiellement indépendants l'un de l'autre.

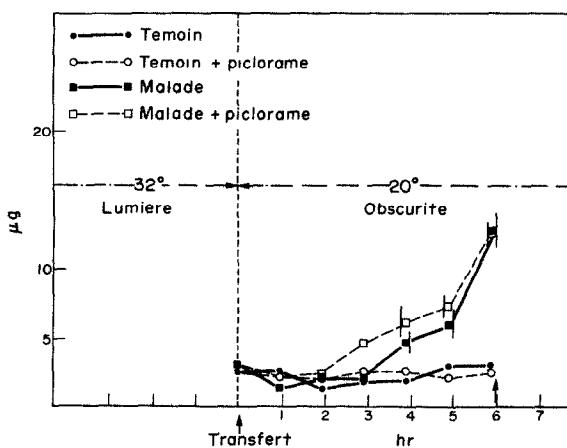


Fig. 2. Activité PAL à l'obscurité (en μg d'acide cinnamique formé par hr et par g de poids frais) de sommets de *Nicotiana tabacum* var. Xanthi n.c. sains ou malades traités ou non au piclorame à $5 \times 10^{-4}\text{M}$. La flèche indique l'apparition des nécroses sur les plantes malades. Le pourcentage de variation de part et d'autre de la valeur moyenne est indiqué.

Les tentatives visant à mettre en évidence la présence éventuelle d'isoenzymes de la PAL se sont révélées vaines. Par ailleurs, en aucun cas, le piclorame n'a d'action *in vitro* sur l'activité de l'enzyme. En conclusion, l'interaction d'un herbicide à propriétés hormonales et d'une infection virale a permis de dissocier l'importante augmentation d'activité de la PAL due au virus de celle dépendant de la photopériode. Mais il est encore impossible de dire dans un cas comme dans l'autre, s'il s'agit d'une action sur la synthèse de l'enzyme ou sur son activation. Ces premiers résultats permettent d'aborder sous un angle nouveau le mode d'action des hormones à activité auxinique chez les végétaux, mais aussi l'étude des importants dérèglements hormonaux consécutifs à une attaque virale.

CONDITIONS EXPERIMENTALES

Des *Nicotiana tabacum* var. Xanthi n.c. végétatifs, élevés en serre, sont transférés dans une salle climatisée à 32° sous un éclairement de 12000 lx, une humidité relative de 70% et une photopériode de 16 hr. Au temps zéro, correspondant au début d'une photopériode, la moitié des plantes est inoculée mécaniquement sur la deuxième feuille ayant terminé sa croissance avec une solution purifiée de virus de la mosaïque du tabac (V.M.T.) et à l'aide de carborundum. 64 hr après, la moitié des plantes saines et la moitié des plantes malades sont arrosées avec 100 ml d'une solution de piclorame à 5×10^{-4} M. A 75 hr, c'est-à-dire 3 hr après le début de la photopériode, toutes les plantes sont transférées dans une salle à 20°. Les nécroses dues à la réaction hypersensible deviennent visibles sur les feuilles du sommet vers la 6 ème heure suivant le retour à 20°.

Les prélèvements pour détermination d'activité enzymatique débutent à 32° pendant la période obscure suivant le traitement herbicide. Ils sont effectués ensuite à intervalles réguliers sur quatre sortes de plantes: plantes saines; plantes saines traitées au piclorame; plantes malades; et plantes malades traitées au piclorame. Précisons que les modifications d'activité enzymatique ci-dessus décrites sont comparables si le transfert à 20° a lieu à la fin de la troisième période obscure, c'est-à-dire au début de la quatrième période lumineuse.

Les conditions expérimentales des essais effectués à l'obscurité sont identiques; cependant l'inoculation et le transfert

à 20° sont réalisés en fin de photopériode. Les prélèvements pour détermination d'activité enzymatique débutent donc à 20° au début de la période obscure.

Chaque mesure porte sur un sommet de plante c'est-à-dire sur l'apex, les jeunes feuilles ainsi que la première feuille ayant cessé sa croissance et la tige correspondante. Toutes les expériences sont repétées au minimum trois fois sur des plantes de même âge dont les semis sont échelonnés dans le temps.

Extraction de l'enzyme: Après pesée, les tissus sont broyés à 20° dans un tampon borate 0,1M, pH 8,8, à raison de 500 mg de poids frais par ml, en présence de noir végétal (100 mg par g de poids frais). On centrifuge 30 min à 48000 g. L'activité phénylalanine ammoniac lyase (PAL) est déterminée sur le surnageant [13].

Mélange réactionnel. Dans les cuves (3 ml) d'un spectrophotomètre, thermostatées à 30°, on place: le tampon borate: 0,14 M, pH 8,8, la phénylalanine: 0,03 M, l'extrait enzymatique: 1 ml. Dans la cuve de référence, le substrat est remplacé par le tampon borate. On mesure pendant 30 min la variation d'absorbance à 290 nm correspondant à la transformation de la phénylalanine en acide cinnamique. Les résultats sont exprimés en µg d'acide cinnamique formé par g de poids frais et par unité de temps.

BIBLIOGRAPHIE

1. Holmes, F. O. (1929) *Bot. Gaz.* **87**, 39.
2. Samuel, G. (1931) *Ann. Appl. Biol.* **18**, 494.
3. Martin, C. et Gallet, M. (1966) *C.R. Acad. Sci. Paris, sér. D* **262**, 646.
4. Tanguy, J. (1970) Thèse de doctorat, Paris.
5. Paynot, M., Martin, C. et Giraud, M. (1973) *C.R. Acad. Sci. Paris, sér. D* **276**, 669.
6. Paynot, M., Martin C. et Giraud M. (1973) *C.R. Acad. Sci. Paris, sér. D* **277**, 1713.
7. Koukol, J. et Conn, E. E. (1961) *J. Biol. Chem.* **236**, 2692.
8. Paynot, M., Martin C. et Giraud M. (1971) *C.R. Acad. Sci. Paris sér. D* **273**, 537.
9. Vallee, J. C., Paynot, M., Martin, C., Vansuyt, G., et Prevost J. (1975) *Phytochemistry* **14**, 2147.
10. Zucker, M. (1965) *Plant Physiol.* **40**, 779.
11. Mohr, H. (1966) *Photochem. Photobiol.* **5**, 469.
12. Engelsma, G. (1967) *Planta (Berlin)* **75**, 207.
13. Rissland, I. et Mohr, H. (1967) *Planta (Berlin)* **77**, 239.