

UN ESSAI D'INFECTION DIRECTE DES CELLULES DU PARENCHYME DE LA FEUILLE DE TABAC À L'AIDE DE VIRUS DE LA MOSAÏQUE MARQUÉ PAR LE ^{14}C ET LE ^{32}P . SORT DU VIRUS

par

R. JEENER ET C. VAN RYSSELBERGE

Laboratoire de Physiologie animale, Université de Bruxelles (Belgique)

INTRODUCTION

Il a été impossible jusqu'à présent de suivre le sort du virus de la mosaïque du tabac au cours des premiers stades de sa multiplication, le nombre de particules de virus participant effectivement à l'infection à la suite de l'habituelle application d'une solution de virus sur l'épiderme étant infime. Aussi avons-nous cherché à augmenter le nombre de cellules simultanément infectées et la quantité de virus entrant en réaction en infiltrant la solution infectieuse par les stomates dans les espaces pleins d'air séparant les cellules parenchymateuses. Cette tentative n'a pas été fructueuse, mais elle nous a conduits à la constatation inattendue que le virus infiltré pouvait pénétrer massivement dans les cellules parenchymateuses sans y provoquer d'infection.

Nous croyons utile de publier quelques détails sur ce fait, à première vue paradoxal, mais qui pourrait peut-être s'expliquer si nous admettions que le virus subit au niveau des cellules épidermiques seules une activation analogue à celle subie par le phage dès son entrée en contact avec les récepteurs spécifiques de la membrane bactérienne.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Du virus, marqué simultanément par le ^{14}C et par le ^{32}P , est obtenu par culture sur des feuilles détachées de la plante, posées sur de l'ouate imprégnée de solution de Vickery (0.116 g CaCl_2 ; 0.437 g $\text{MgSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$; 0.276 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ par litre; pH 6.4 ajusté avec KOH 0.2 *M*) contenant du phosphate marqué par le ^{32}P , et éclairées par des lampes fluorescentes dans de l'air contenant du $^{14}\text{CO}_2$. Il est purifié par 3 cycles de centrifugations à basse et haute vitesses, puis par 3 cycles de précipitations à pH 4.7 et pH 3.4 suivant la technique de COMMONER³.

L'infiltration de virus ainsi préparé, à la concentration de 0.025 % dans une solution contenant 1.011 g KNO_3 , 1.321 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ par litre et tamponnée à pH 5.8 par du tampon phosphate 0.01 *M*, est opérée sous vide. Après élimination de l'eau en excès par un fort courant d'air sec, les feuilles sont placées à la surface d'une solution de Vickery et maintenues à 22° sous éclairage par lampes fluorescentes.

Le virus est dosé par précipitation à l'aide d'antisérum de lapin à partir d'un extrait de feuilles préalablement congelé, amené à la température du laboratoire et centrifugé 10 minutes à 10,000 r.p.m.

Le fractionnement des feuilles est réalisé à l'aide d'une centrifugeuse Serval refroidie, à partir d'un extrait dans la solution de Chambers modifiée (5.2 g KCl; 1.75 g NaCl; 2.5 g citrate Na; 0.2655 g KH_2PO_4 ; 0.5433 g Na_2HPO_4 par litre), obtenu par un traitement de 3 minutes dans l'homogénéiseur Osterizer.

La radioactivité du ^{32}P est mesurée sur solutions ou suspensions à l'aide d'un compteur à paroi de verre. Les radioactivités du ^{32}P et du ^{14}C des poudres sèches sont mesurées avec un compteur à fenêtre de mica mince, un absorbeur d'aluminium permettant de supprimer complètement les particules émises par le ^{14}C , tout en n'arrêtant qu'une fraction de celles émises par le ^{32}P .

Bibliographie p. 239.

RÉSULTATS

Influence du mode d'infection de la feuille sur la multiplication du virus

L'infection des feuilles de *Nicotiana tabacum* est réalisée de trois manières à l'aide d'une même solution de virus:

1. La solution de virus est étalée avec le doigt sur la surface de la feuille qui subit de ce fait des lésions locales.
2. La feuille intacte est plongée pendant 10 minutes dans la solution de virus.
3. La feuille intacte est plongée dans la solution de virus, et ses espaces inter-cellulaires sont infiltrés de cette solution sous vide; durée de contact de la feuille avec la solution: 10 minutes.

Lorsque la solution de virus a été étalée sur la surface lésée de la feuille, le développement du virus est beaucoup plus considérable que dans les deux autres cas. Que la feuille ait été simplement plongée dans la solution de virus ou, de plus, infiltrée de cette solution, le développement du virus s'effectue avec la même vitesse. Il semble donc que le contact du virus avec les membranes des cellules parenchymateuses, bien que réalisé sur une surface 20 à 30 fois plus grande que la surface extérieure de la feuille, ait été totalement inefficace.

Cette conclusion, identique à celle de CALDWELL¹, se trouve confirmée par le fait que le traitement superficiel de feuilles infiltrées de virus par de l'antisérum diminue massivement la quantité de virus qui se développe. Nous ne donnerons, à titre d'exemple, que les résultats d'une expérience de cette série. Des feuilles de *Nicotiana tabacum* sont infiltrées d'une solution de virus à 0.025 %, puis lavées et plongées pendant 30 minutes dans de l'antisérum. Après élimination de l'antisérum par lavage prolongé à l'eau, une moitié de chaque feuille est incubée sans autre traitement. L'autre moitié subit une infection superficielle par application à l'aide du doigt de la solution de virus utilisée pour l'infiltration et est incubée. Après 4 jours, la quantité de virus recueillie dans les demi-feuilles simplement infiltrées dépasse à peine la quantité introduite par infiltration; la quantité de virus recueillie dans les demi-feuilles infiltrées et infectées superficiellement est au contraire considérable (Tableau I).

TABLEAU I
QUANTITÉS DE VIRUS SYNTHÉTISÉES APRÈS 5 JOURS
(γ N du précipité par antisérum)

No. de l'expérience	Demi-feuilles infiltrées	Demi-feuilles infiltrées et frottées superficiellement
1	56.4	368
2	62.4	358
3	57	311

Des feuilles de *Nicotiana glutinosa* ont été également infectées par les 3 procédés ci-dessus. L'étalement de la solution de virus sur l'épiderme fait apparaître d'innombrables taches de nécrose et les quantités de virus dosées immunologiquement après trois jours sont importantes. Par contre la simple immersion des feuilles dans la solution de virus ou l'immersion accompagnée d'infiltration ne conduisent qu'à l'apparition de

une ou deux taches de nécrose par feuille, et aucune trace d'une production de virus ne peut être détectée immunologiquement après trois jours.

Sort du virus infiltré, marqué par le ^{14}C et le ^{32}P .

Du virus marqué dans sa partie nucléique par le ^{32}P , dans sa partie nucléique et dans sa partie protéique par le ^{14}C , est infiltré par les stomates. Les feuilles sont divisées en deux parties égales le long de leur nervure principale. L'une des moitiés est étudiée immédiatement après l'infiltration, l'autre 24 ou 48 heures plus tard, après incubation à 22° C et à la lumière, sur solution physiologique de Vickery.

Des homogénats des deux lots de demi-feuilles dans la solution de Chambers sont centrifugés à 3,000 r.p.m., pendant 30 minutes, puis à 10,000 r.p.m., pendant le même temps. Les radioactivités du ^{32}P de chaque homogénat et des deux liquides surnageants successivement obtenus sont mesurées à l'aide du compteur à solutions.

Les résultats sont très différents suivant que le fractionnement est effectué immédiatement après l'infiltration (0 heure) ou 48 heures plus tard. A 0 heure, les deux centrifugations successives à 3,000 r.p.m. et 10,000 r.p.m., additionnant leurs effets, abaissent la radioactivité de l'extrait de 4 à 6% seulement, c'est-à-dire d'une manière probablement dépourvue de signification, compte tenu de la dispersion des mesures. Au contraire, 48 heures après l'infiltration du virus, 64.5% du ^{32}P de l'extrait total sont entraînés dans le culot de la centrifugation à 3,000 r.p.m., et 12.4% dans celui de la centrifugation à 10,000 r.p.m., La partie du ^{32}P total liée à des structures éliminées par une centrifugation de 10 minutes à 10,000 r.p.m. est donc maintenant de 76.8% au lieu de 6% maximum au temps 0.

Les résultats obtenus sont les mêmes si les extraits ont été effectués dans une solution de sucrose 0.25 M.

Il a paru nécessaire de vérifier que les modifications de la répartition du ^{32}P entre les fractions après 48 heures ne sont pas dues à une altération banale des tissus et par conséquent des propriétés de l'homogénat (modifications de pH résultant d'une autolyse, dénaturation ou précipitation de protéines, etc...). A cet effet, nous avons recommencé les expériences ci-dessus en prenant comme matériel pour la préparation des homogénats "temps 0" des feuilles ayant subi, 48 heures plus tôt, une infiltration de solution dépourvue de virus et incubées jusqu'au moment de leur emploi dans les conditions habituelles. Immédiatement après l'infiltration de virus marqué, le fractionnement de ces feuilles permet de retrouver la quasi totalité du ^{32}P dans le liquide surnageant de la centrifugation de 10 minutes à 10,000 r.p.m.

Les culots de centrifugation à 3,000 r.p.m. et 10,000 r.p.m. obtenus dans les fractionnements réalisés 48 heures après l'infiltration de virus sont réunis et remis en suspension dans du liquide de Chambers. Les membranes cellulaires, complètement vidées de leur contenu et restées unies en petits amas, sont séparées des autres constituants de la suspension par une filtration sur soie à bluter très fine et des lavages répétés à l'aide de liquide de Chambers. En dehors des membranes cellulaires, les culots contiennent des chloroplastes intacts, des grana libérés par la destruction d'une partie des chloroplastes, des particules cytoplasmiques de nature vraisemblablement mitochondriale et des noyaux ou fragments de noyaux. Ce mélange de plastes et de particules est désintégré par passage sous pression par un robinet à pointe qui détruit les plastes intacts en libérant leurs grana. La suspension obtenue est centrifugée à 10,000 r.p.m. et les particules sédimentées sont remises plusieurs fois en suspension dans du liquide

de Chambers. Les constituants radioactifs (^{32}P) liés aux culots ne sont pas extraits par ce traitement et restent solidement liés à des particules sédimentant à 10,000 r.p.m., bien que la solution de Chambers soit un excellent solvant du virus. Nous n'avons pas cherché à préciser si ces liens sont établis avec des constituants des plastes, des mitochondries ou des noyaux. Le Tableau II donne la répartition dans les diverses fractions de la radioactivité du ^{32}P du virus infiltré.

TABLEAU II
(radioactivités rapportées à un même poids de feuilles)

	Temps 0 heure	Temps 48 heures
Membranes	9 c/m 135 c/m	76.8 c/m { 42.6 c/m 34.2 c/m
Plastes, mitochondries, etc.		
Liq. surn. 10,000 r.p.m., 10 min		

Pour interpréter ce résultat, nous avons à examiner si la présence de ^{32}P dans les membranes ou les particules après 48 heures traduit l'établissement de liens entre le virus infiltré et les constituants cellulaires ou une simple incorporation dans les constituants normaux de la cellule de phosphate inorganique, de bases puriques et pyrimidiques ou d'acides aminés marqués résultant d'une dégradation du virus.

Les observations suivantes nous paraissent plaider en faveur de la première de ces hypothèses.

1. Des poudres sèches, préparées à partir des diverses fractions de feuilles infiltrées depuis 48 heures, après traitement par l'acide trichloracétique, l'alcool et l'éther, contiennent des quantités de ^{14}C et de ^{32}P ayant entre elles approximativement le même rapport (Tableau III).

TABLEAU III
(les radioactivités du ^{14}C et du ^{32}P sont données pour un même poids de substances sèches)

	Radioact. ^{32}P c/m (val. corrigée)	Radioact. ^{14}C c/m (val. corrigée)	Radioact. ^{32}P Radioact. ^{14}C
Virus infiltré (temps 0)	748	335	2.23
Membranes (temps 48 h)	218	82	2.66
Plastes, mitochondries, noyaux (temps 48 h)	237	85	2.79

Il paraît peu vraisemblable que le rapport entre les radioactivités ^{32}P et ^{14}C se soit maintenu dans les diverses fractions si les radioactivités mesurées ne traduisaient pas la présence dans ces fractions d'une partie du virus infiltré, intact ou peu altéré dans sa constitution chimique.

2. Un homogénat de feuilles infiltrées depuis 48 heures de virus marqué par le ^{14}C et le ^{32}P est précipité par l'acide trichloracétique. L'extrait limpide obtenu par centrifugation est débarrassé de l'acide trichloracétique par extraction à l'éther et évaporé. Le produit sec obtenu contient 10 à 12% du ^{32}P infiltré dans les feuilles, mais nous n'avons

pu y détecter de ^{14}C . Cette constatation paraît exclure la possibilité que la radioactivité ^{14}C observée dans la fraction des membranes et celle des plastes, mitochondries, *etc.* résulte d'une synthèse par la plante de constituants normaux de ces fractions à partir d'un pool de petites molécules (acides aminés, nucléotides, bases) résultant de la dégradation du virus infiltré.

3. Un homogénat de feuilles, infiltrées depuis 48 heures de virus marqué comme ci-dessus, est centrifugé à 40,000 r.p.m. pendant 30 minutes, à deux reprises. Il se trouve ainsi complètement débarrassé du virus infiltré. Les protéines du liquide surnageant sont précipitées par l'acide trichloracétique et traitées par l'alcool et l'éther. Aucune trace de ^{14}C ne peut y être détectée.

Les protéines normales étudiées n'ayant pas incorporé de molécules d'acides aminés provenant de la dégradation du virus infiltré, il n'y a aucune raison d'imaginer que les protéines normales des plastes, des mitochondries ou des membranes l'aient fait. La vitesse de renouvellement des protéines normales est en effet du même ordre de grandeur dans les diverses fractions considérées².

Étant ainsi amenés à admettre que le virus infiltré dans les espaces intercellulaires s'incorpore partiellement dans les membranes cellulaires, pénètre dans les cellules et s'y associe à des organites (plastes ou mitochondries), nous avons cherché à le réisoler, à partir des diverses fractions de l'homogénat où se manifeste la radioactivité ^{14}C et ^{32}P , par la méthode de purification préconisée par COMMONER³. Le résultat est facile à atteindre dans le cas du virus présent dans le liquide surnageant de la centrifugation à 10,000 r.p.m., 10 minutes. Ce virus purifié réagit normalement avec l'antisérum spécifique, présente la teneur habituelle en acide ribonucléique et provoque sur *Nicotiana glutinosa* le même nombre de lésions locales que le virus infiltré dans la feuille.

Par contre, il nous a été impossible de réisoler par cette méthode le virus lié aux membranes ou aux grosses particules de l'homogénat. De même, un traitement des membranes par une pectinase et une hémicellulase commerciales ne nous a pas donné de résultats.

Il ne semble pas que le virus soit lié aux particules par simple adsorption superficielle, mais intégré profondément dans leur structure. Nous n'avons en effet pas pu mettre en évidence la fixation sur les particules de la quantité d'anticorps qui aurait dû normalement se combiner avec la quantité de virus correspondant à la radioactivité mesurée.

DISCUSSION

Le virus présent 48 heures après l'infiltration dans le liquide surnageant de centrifugation à 10,000 r.p.m. n'a acquis aucun lien avec des structures cellulaires et pourrait être considéré comme provenant des espaces intercellulaires de la feuille. La fraction du virus liée aux membranes pourrait s'y être incorporée sans les avoir traversées. Par contre, la fraction intimement incorporée à des organites cellulaires (plastes, mitochondries, noyaux) doit avoir pénétré dans les cellules du parenchyme.

A en juger par la radioactivité de ces organites, 10^6 particules de virus, au moins, sont présentes dans chaque cellule. Si ces particules avaient été infectieuses, il n'y a pas de doute qu'elles eussent été le point de départ d'un développement rapide et massif de virus.

Il est exclu que la synthèse de virus ait été rendue impossible par l'entrée dans les

cellules de trop nombreuses particules puisque celles-ci restent capables de synthétiser du virus lorsqu'une infection de l'épiderme par la technique habituelle est réalisée (Tableau I). L'absence de multiplication des particules introduites par infiltration doit donc être expliquée autrement.

Une hypothèse de travail à exploiter dans ce but nous paraît être la suivante. Supposons que les cellules de l'épiderme de la feuille de tabac, voie normale de l'infection, contiennent dans leurs membranes une substance activatrice fonctionnant comme celle d'un *Escherichia coli* infecté par un phage T₂, c'est-à-dire capable de libérer à partir du virus inactif le constituant responsable de la multiplication (l'acide désoxyribonucléique dans le cas du phage)¹. Si cette substance activatrice n'est pas présente dans les membranes séparant les espaces intercellulaires et le parenchyme, aucune infection ne pourra être provoquée par du virus infiltré par les stomates.

Notons que pareille hypothèse pourrait s'appliquer aux nombreux cas où, chez les virus d'animaux, la voie d'infection et la nature des tissus atteints par le virus ont la plus grande importance pour la multiplication de celui-ci.

D'autre part, il semble peu vraisemblable que les particules de virus n'ayant pas subi d'activation au niveau des membranes des cellules parenchymateuses ne puissent de ce fait pénétrer dans celles-ci, comme elles le font dans les cellules d'un foie ou d'une rate de Mammifère (GAVOSTO ET FICQ⁵), ou comme la ribonucléase pénètre dans les cellules d'une racine d'oignon (BRACHET⁶). Nous nous expliquerions donc ainsi sans trop de peine la présence de particules inactives du virus de la mosaïque à l'intérieur des cellules du parenchyme.

Signalons qu'une autre hypothèse rendrait, en principe, compte des faits décrits dans ce travail. Elle consisterait à imaginer que le passage du virus par les membranes du parenchyme l'inactiverait. Nous n'insisterons pas sur cette interprétation qui paraît gratuite à l'heure actuelle.

RÉSUMÉ

Du virus de la mosaïque du tabac marqué par le ³²P et par le ¹⁴C est introduit par infiltration dans les espaces intercellulaires des feuilles et mis ainsi en contact avec les cellules du parenchyme. Une part importante du ³²P et du ¹⁴C du virus se trouve incorporée après 48 heures à des organites intracellulaires. Le rapport entre les quantités de ¹⁴C et de ³²P présentes dans ces organites est identique à celui réalisé dans le virus initialement infiltré. D'autre part, les protéines normales et les acides aminés libres ne sont pas marqués par le ¹⁴C. Il semble donc que le virus infiltré ait pénétré tel quel dans les cellules. Cependant le virus infiltré dans les feuilles ne s'y multiplie pas. Ce dernier fait est expliqué par le rôle que jouerait dans la multiplication du virus une phase initiale d'activation qui se réaliserait seulement au contact des cellules épidermiques.

SUMMARY

Tobacco mosaic virus labelled with ³²P and ¹⁴C is infiltrated in the intercellular spaces of leaves where it enters in contact with the parenchyme cells. After 48 hours, an important part of the ³²P and ¹⁴C of the virus is found incorporated in intracellular organites. The ratio of the amounts of ¹⁴C and ³²P present in these organites is identical with that of the initially infiltrated virus. On the other hand, the normal proteins and the free amino acids are not labelled by ¹⁴C. It seems therefore that the infiltrated virus has penetrated within the cells. However, the infiltrated virus does not multiply. This last fact could be explained by the necessity for virus multiplication of an initial activation, possible only by the contact with the epidermal cells.

ZUSAMMENFASSUNG

Tabakmosaikvirus, welcher mit ^{32}P und ^{14}C markiert war, wurde durch Einsickern in die Zellzwischenräume eingeführt, und so mit dem Parenchym der Zellen in Berührung gebracht. Ein beachtlicher Teil des ^{32}P und des ^{14}C des Virus war nach 48 Stunden in Organiten innerhalb der Zellen einverleibt. Das Verhältnis zwischen den in den Organiten vorhandenen Mengen von ^{14}C und ^{32}P ist dasselbe, wie in dem ursprünglich eingesickerten Virus. Andererseits werden die normalen Proteine und die freien Aminosäuren nicht mit ^{14}C markiert. Demnach hat es den Anschein, als ob der eingesickerte Virus in seiner ursprünglichen Form in die Zellen eingedrungen wäre. Doch vermehrt sich der in die Blätter eingesickerte Virus nicht. Dies wird dadurch erklärt, dass für die Vermehrung des Virus eine anfängliche Aktivationsperiode, welche nur in Berührung mit Epidermazellen möglich wäre, vonnöten sei.

BIBLIOGRAPHIE

- ¹ J. CALDWELL, *Ann. Appl. Biol.*, 18 (1931) 279; *ibid.*, 19 (1932) 144; cité d'après F. C. BAWDEN, *Plant Viruses and Virus Diseases*, Waltham, Mass., 1950.
- ² R. JEENER, non publié.
- ³ B. COMMONER, F. MERCER, P. MERRIL ET A. ZIMMER, *Arch. Biochem.*, 27 (1950) 271.
- ⁴ A. HERSHEY ET M. CHASE, *J. Gen. Physiol.*, 36 (1951) 39.
- ⁵ F. GAVOSTO ET A. FICQ, *Ann. Inst. Pasteur*, 86 (1954) 320.
- ⁶ J. BRACHET, *Nature*, 174 (1954) 876.

Reçu le 21 décembre 1954