

CARACTERISATIONS IMMUNOCHIMIQUES DE DEUX AUXINE OXYDASES EXTRAITES DE TUMEURS VEGETABLES

J. DAUSSANT

Physiologie des Organes Végétaux, C.N.R.S., Bellevue 92, France

J. ROUSSAUX et P. MANIGAULT

Oncologie Végétale, Institut Pasteur, Paris 15^e, France

Received 22 March 1971

Two auxin oxidases with distinct antigenic specificities have been identified in extracts of plant tumor induced in *Datura stramonium* by *Agrobacterium tumefaciens*. Auxin oxidase and peroxidase activities are demonstrated for both enzymes. The adaptation of an immunochemical method allows the quantitative evaluation of both enzymes in different plant tissue extracts. The amount of these enzymes which is low in the organ of the healthy plant increases during tumorisation, healing and in vitro culture of healthy tissues.

1. Introduction

L'étude des conditions qui accompagnent l'induction tumorale au niveau moléculaire semble devoir être facilitée dans le cancer végétal (Crown Gall) puisque celui-ci peut être induit dans une plante par la conjonction de deux événements précis: la présence d'une bactérie, *Agrobactérium tumefaciens*, au niveau d'une blessure récente. Cette tumorisation est accompagnée d'un changement profond dans l'exigence des tissus vis à vis de l'acide β -indolylacétique [1]: Alors que l'hormone est indispensable pour maintenir des cultures in vitro de tissus sains, elle n'est pas nécessaire à la culture in vitro de tissus tumoral. Comme certaines peroxydases paraissent devoir jouer un rôle important dans le catabolisme auxinique [2] et dans l'activation biologique de l'hormone [3], il semble qu'une étude de ces enzymes pourrait concerter un phénomène caractéristique de l'induction tumorale. Une étape préliminaire de cette étude consiste à identifier parmi ces peroxydases celles qui effectivement portent une activité auxine oxydase et à mettre au point une méthode capable de doser ces enzymes à partir des différents extraits tissulaires.

Dans cette lettre nous rapportons l'identification dans les extraits de tumeurs de deux auxine oxydases antigéniques qui correspondent à des espèces moléculaires distinctes et qui présentent aussi une activité

peroxydase. Nous décrivons les conditions d'adaptation d'une méthode immunoélectrophorétique quantitative au dosage de ces enzymes à partir de différents extraits tissulaires. Cette méthode a permis de montrer qu'un changement dans la régulation de ces enzymes est en cause au niveau de leur synthèse ou de leur dégradation lors de la tumorisation, de la cicatrisation, de la mise en culture in vitro de tissus sains.

2. Matériel et méthodes

Les tumeurs de *Datura stramonium* sont obtenues par inoculation d'*Agrobactérium tumefaciens*, souche B 6, à des plantes âgées de trois semaines. Ces tumeurs sont récoltées après un délai d'un mois environ. Les tiges et les tissus cicatriciels sont prélevés sur des plantes du même âge. Les souches de tissus sains de *Datura* ont été entretenues sur milieu de Murashige et Skoog [4].

Les tissus préalablement congelés dans l'azote liquide sont broyés au mortier jusqu'à obtention d'une fine poudre puis additionnés de tampon tris 10^{-1} M pH 7,4 (poids/volume = 1/3). La suspension est alors homogénéisée au Turmix pendant une minute à grande vitesse puis centrifugée à 6.000 g pendant 30 min et à 100.000 g pendant une heure. Les ex-

traits sont dialysés pendant 36 h contre du tampon tris 10^{-1} M pH 7,4 puis 36 h contre de l'eau distillée, et enfin lyophilisés.

Les extraits bactériens sont préparés à partir de cultures de 24 h ayant poussé sur milieu de Stoll additionné de lactate [5]. Ces cultures sont récoltées par centrifugation, lavées à deux reprises à l'eau physiologique puis congelées dans l'azote liquide. La technique d'extraction est la même que celle utilisée pour les extraits tissulaires.

L'électrophorèse a été effectuée en gel d'ionagar' 1,2% en tampon véronal 0,025 M pH 8,2 sous une tension de 4,5 V/cm pendant 1 h 30 min. L'immunoélectrophorèse qualitative [6] a été utilisée dans les conditions d'électrophorèse précédentes. L'immunoélectrophorèse quantitative [7] a été adaptée suivant les conditions décrites plus loin.

Un immun sérum antitumeur a été préparé en injectant 7 mg de préparation protéique lyophilisé de tumeur en suspension dans 1 ml d'eau physiologique par voie souscutanée avec adjuvant de Freund à un lapin. L'injection est répétée 2 fois à un mois d'intervalle. La saignée est effectuée deux semaines après la dernière injection.

Les caractérisations enzymatiques ont été effectuées immédiatement après électrophorèse pour les électrophorogrammes, après apparition des précipités spécifiques

Un immun sérum antitumeur a été préparé en injectant 7 mg de préparation protéique lyophilisée de tumeur en suspension dans 1 ml d'eau physiologique par voie souscutanée avec adjuvant de Freund à un lapin. L'injection est répétée 2 fois à un mois d'intervalle. La saignée est effectuée deux semaines après la dernière injection.

Les caractérisations enzymatiques ont été effectuées immédiatement après électrophorèse pour les électrophorogrammes, après apparition des précipités spécifiques puis lavages des gels à l'eau physiologique pendant trois jours pour les immunoélectrophorogrammes. Pour les peroxydases, après des essais préliminaires [8], la réaction utilisant le guaiacol comme donneur d'hydrogène [9] à pH 5 a été employée. Pour les auxine oxydases, la technique de Endo [10] a été utilisée, la réaction se produisant à l'obscurité pendant 16 h.

3. Résultats

3.1. *Identification de deux auxine oxydases dans l'extrait tumoral*

Lors d'un travail précédent [8], huit peroxydases ont été décelées par électrophorèse en gel d'agar dans les extraits de tumeur. Sur les figs. 1a et 1b on voit que parmi ces enzymes classées dans quatre groupes suivant leurs mobilités électrophorétiques deux constituants présentent l'activité auxine oxydase. Cette activité semble bien caractéristique de ces deux constituants puisqu'elle n'apparaît pas au niveau des autres peroxydases, même si des quantités quatre fois plus importantes d'extrait sont soumises à l'électrophorèse (fig. 1c).

Afin d'obtenir une meilleure définition de ces enzymes, l'analyse immunoélectrophorétique a été utilisée. Les résultats des immunoélectrophorèses d'extraits de tumeur effectuées en utilisant le sérum antitumeur et après caractérisation des activités peroxydases et auxine oxydases sont reportés sur les figs. 1d et 1e. Ces activités apparaissent sur deux arcs de précipités spécifiques de même situation et de même forme dans les immunoélectrophorogrammes. La double caractérisation enzymatique effectuée sur chacun de ces précipités spécifiques (fig. 1f) apporte la preuve que ces antigènes portent à la fois l'activité auxine oxydase et l'activité peroxydase. L'analyse immunoélectrophorétique effectuée sur un temps plus court (fig. 1g) permet d'observer des réactions de non identité antigénique entre ces deux enzymes. Ce résultat précise que ces deux enzymes présentent des spécificités antigéniques distinctes ce qui permet de les considérer comme étant d'espèces moléculaires différentes.

3.2. *Méthode immunochimique de dosage des deux espèces d'auxine oxydases*

Les résultats précédents permettent d'envisager le dosage de ces enzymes par l'adaptation d'une méthode immunoélectrophorétique quantitative [7]. Cette méthode consiste à faire migrer les protéines dans un gel contenant l'immun sérum uniformément réparti. Après électrophorèse on observe que la surface des pics de migration et leur hauteur, dans certaines conditions, sont proportionnelles à la quantité de protéines soumises à l'électrophorèse (fig. 2). A l'aide de cette méthode nous avons évalué dans quelles proportions

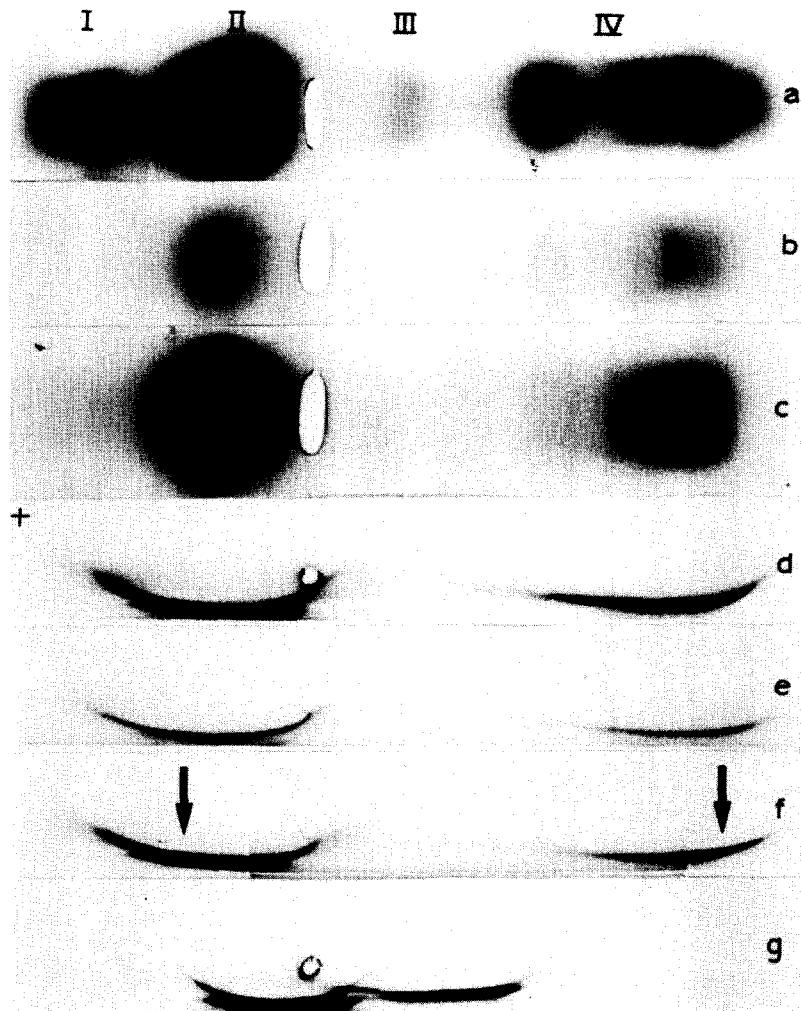


Fig. 1. Electrophorèse en gel d'agar (a, b, c) et analyse immunoélectrophorétique (d, e, f, g) d'extrait tumoral, (temps d'électrophorèse réduit pour g). Caractérisation des peroxydases (a, d, g). Caractérisation des auxine oxydases (b, c, e). Caractérisation simultanée des auxine oxydases (f, centre de l'électrophorégramme) et des peroxydases, (f, parties extrêmes de l'électrophorégramme marquées d'une flèche).

ces auxine oxydases apparaissent dans les différents extraits tissulaires par rapport aux quantités de ces enzymes, prises comme unités, présentes dans les extraits de tumeurs. Les conditions d'analyse sont les suivantes: Des quantités croissantes d'extrait de tumeur ont été soumises à l'électrophorèse dans un gel contenant uniformément réparti l'immun serum antitumeur. Des quantités déterminées d'extrait de tige saine, de tissus cicatriciels, de tige saine en culture in vitro ont été soumises aux mêmes conditions

d'électrophorèse dans le gel contenant l'immun serum antitumeur. Après électrophorèse, lavage des gels pour éliminer les protéines ne participant pas aux précipités spécifiques, une caractérisation enzymatique a pour but d'identifier parmi les précipités spécifiques visibles, ceux qui correspondent aux auxine oxydases. Pour chaque antigène, on peut construire une échelle de référence établissant une relation entre leurs distances de migration en fonction des quantités de protéines tumorales soumises à l'essai (fig. 3A). A

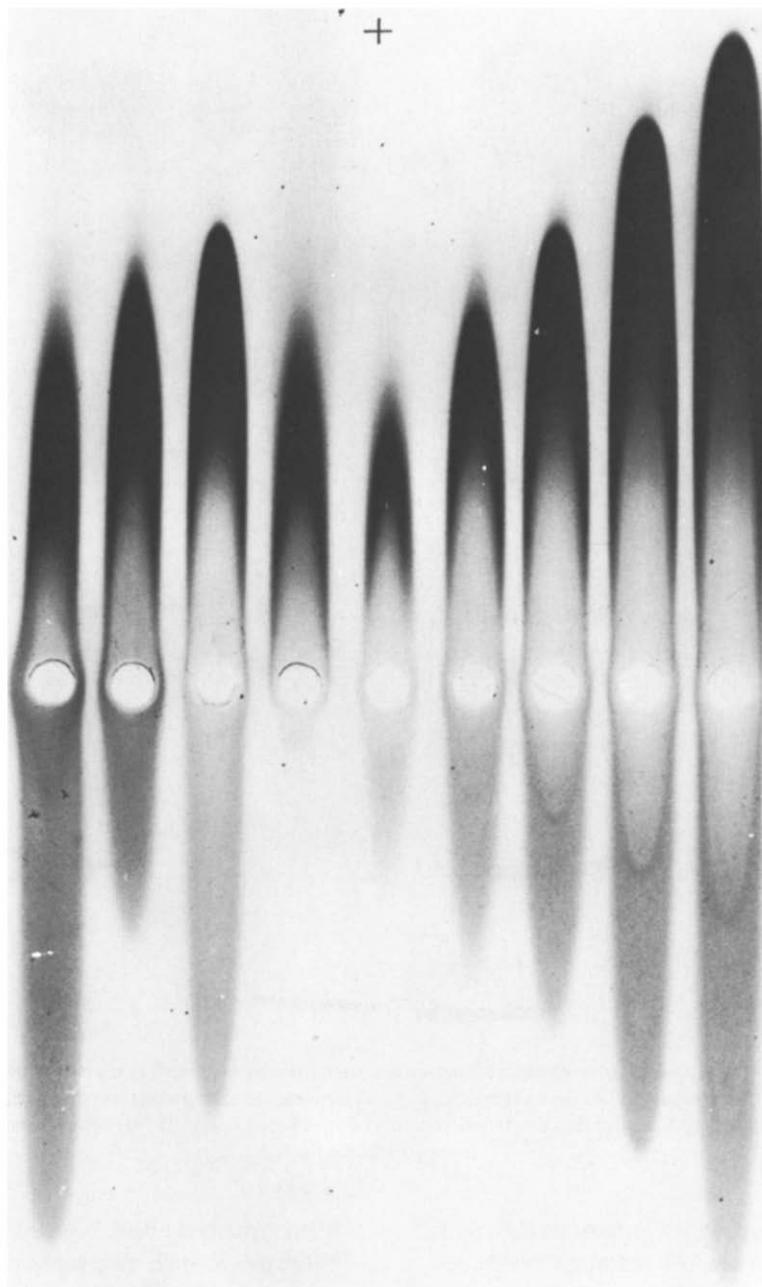


Fig. 2. Analyse immunoélectrophorétique quantitative en gel d'agarose 1% contenant 3,5% d'immunsérum antitumeur. Quantités d'échantillons déposés avant électrophorèse dans les réservoirs de droite à gauche:

Protéines de tumeur: 25, 20, 15, 5 ng.

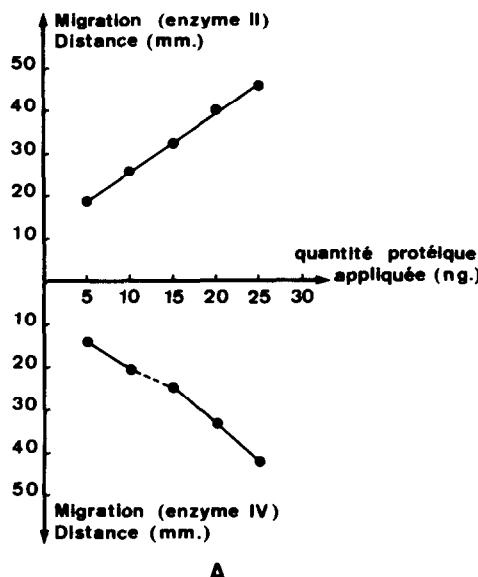
Protéines de tige saine: 60 ng.

Protéines de tissus cicatriciels prélevés 5 jours après blessure 16 ng.

Protéines de tissus cicatriciels prélevés 10 jours après blessure 60 ng.

Protéines de tige en culture in vitro: 5 ng.

Électrophorèse effectuée sous une tension de 6,4 V/cm pendant 9 h.



A

enzyme extraits	II	IV
Ti	0,1	
C5	1	1,5
C10	0,2	0,5
TiC	5	4,5

B

Fig. 3(A) Relations entre les distances de migration électrophorétique pour chacun des antigènes II et IV et la quantité de protéines d'extrait tumoral soumise à l'essai. Enzyme anodique partie supérieure, enzyme cathodique partie inférieure de la figure.

Fig. (B) Rapport entre les quantités d'antigène décelées dans les extraits des différents tissus et la quantité d'antigène présente dans l'extrait tumoral pour des quantités égales de préparations protéiques soumises à l'essai.

Ti : tige saine

c5 : tissu cicatriciel prélevé 5 jours après blessure

c10 : tissu cicatriciel prélevé 10 jours après blessure

Tic : tissu de tige en culture in vitro

II : antigène anodique

IV : antigène cathodique

partir d'une certaine quantité protéique d'un extrait tissulaire soumise à l'essai on pourra donc faire correspondre la quantité de protéine tumorale donnant le même déplacement de l'antigène. Le rapport entre ces deux quantités (tumeur/tissus) exprimera, sur la base d'une même quantité protéique totale, la proportion d'antigène présent dans un extrait tissulaire par rapport à la concentration de cet antigène dans l'extrait tumoral (fig. 3B). Ces résultats, indicatifs tant que l'échelle de référence ne sera pas constituée à partir des enzymes purifiées, indiquent cependant qu'un accroissement de la quantité des enzymes II et IV se produit à l'occasion de la tumorisation, de la cicatrisation et de la mise en culture in vitro du tissu sain: La quantité d'auxine oxydase anodique (II) est multipliée par un facteur 10 lors de la tumorisation, par un facteur 50 lors de la mise en culture du tissu sain, par un facteur 10 lors de la cicatrisation, mais la

quantité de l'enzyme est moins élevée dans les tissus prélevés à la fin du processus de cicatrisation. L'auxine oxydase cathodique (IV) est pratiquement inexiste dans les tissus sains. Elle existe en quantités comparables dans les extraits de tumeur et de tissus prélevés à une phase active de la cicatrisation. Comme c'est le cas pour l'enzyme anodique, elle existe en quantité bien plus importante dans les extraits de tissus sains en culture in vitro que dans les extraits de tumeur.

4. Discussion

Dans l'étude des modifications au niveau moléculaire qui accompagnent l'induction tumorale, les auxine oxydases ont été retenues à cause de leur implication dans le catabolisme et l'activation de l'acide

β -indolylacétique [2, 3], hormone dont l'importance biologique dans les tissus est profondément modifiée lors de la tumorisation [1].

Deux auxine oxydases antigéniques d'espèces moléculaires distinctes ont été identifiées dans les extraits tumoraux. La caractérisation simultanée des deux activités auxine oxydase et peroxydase sur une même entité protéique définit pas sa spécificité antigénique apporte une preuve nouvelle de l'identification des auxine oxydases aux peroxydases [11]. Par ailleurs, les caractérisations enzymatiques effectuées après électrophorèse des extraits tumoraux suggèrent et confirment que les rapports des activités auxine oxydase et peroxydase diffèrent suivant les peroxydases décelées [10]. A partir de différents organes ou tissus de la plante saine, ces deux enzymes ont été identifiées avec les mêmes mobilités électrophorétiques et les mêmes spécificités antigéniques que celles qu'elles présentent dans l'extrait de tumeur [8]. Il est alors apparu possible d'adapter une méthode d'analyse immunoélectrophorétique quantitative au dosage de chacune de ces enzymes dans les différents extraits. La caractérisation enzymatique effectuée sur les précipités spécifiques a permis d'utiliser pour cette même méthode le sérum antitumeur dont nous disposions qui n'est pas spécifique seulement de ces deux protéines. La mise au point de cette méthode permettra d'étudier les variations quantitatives de chacune de ces isoenzymes à partir de différents organes de la plante, de tissus sains et tumoraux en culture in vitro. Les résultats préliminaires que nous rapportons montrent en effet qu'un changement dans la régulation de chacune de ces enzymes est en cause au niveau de leur synthèse ou de leur dégradation lors de la tumori-

sation, de la culture in vitro de tissu sain, de la cicatrisation. L'augmentation considérable de la quantité de ces enzymes dans les tissus sains en culture in vitro, culture effectuée en présence d'acide β -indolylacétique exogène, suggère que leur régulation est contrôlée par cette hormone.

Remerciements

Nous tenons à remercier Mademoiselle Aladame pour sa collaboration technique. Nous tenons à remercier Monsieur Morel (I.N.R.A., Versailles) qui a bien voulu mettre à notre disposition les souches de tissus sains de *Datura stramonium*.

Références

- [1] A.C.Braun, *The Cancer Problem* (Columbia University Press, New York, London, 1969).
- [2] P.E.Pilet et Th.Gaspar, *Le catabolisme auxinique* (Masson, Paris, 1968).
- [3] J.W.Meudt, *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 144 (1967) 118.
- [4] T.Murashige et F.Skoog, *Physiol. Plant.* 15 (1962) 473.
- [5] P.Manigault et C.Stoll, *Phyto Pathol. Z.* 38 (1960) 1.
- [6] P.Grabar et C.A.Williams, *Biochim. Biophys. Acta* 10 (1965) 193.
- [7] C.B.Laurell, *Anal. Biochem.* 15 (1966) 45.
- [8] J.Roussaux, J.Daussant et P.Manigault, *Second International Conferences on Plant Tissue Culture*, Strasbourg (1970).
- [9] V.Macko, G.R.Honold et M.A.Stahmann, *Phytochemistry* 6 (1967) 465.
- [10] T.Endo, *Plant Cell Physiol.* 9 (1968) 333.
- [11] B.Z.Siegel et A.W.Galston, *Science* 157 (1967) 1557.