

## Influence de la carence hydrique sur la repartition cellulaire de l'acide ribonucléique foliaire chez le cotonnier

Par

BERNARD MARIN et JORGE VIEIRA DA SILVA

Orstom, Laboratoire de Physiologie Végétale, Boite Postale 20, Abidjan, Côte-d'Ivoire  
et

Université de Paris VII, UER de Biologie, 2 Place Jussieu, Paris 5<sup>e</sup>, France

(Reçu le 27 Décembre, 1971)

### Abstract

Water stress, induced by addition of polyethyleneglycol 600 to the nutrient solution, reduces the ribonucleic acid content of cotton leaves. The chloroplastic compartment, especially its ribosomal fraction, was most affected, even losing ribonucleic acid to the cytoplasmic compartment. Decrease of ribonucleic acid content on dehydration of leaf tissue is linked with an increase of ribonuclease.

### Introduction

Chez les espèces de *Gossypium* sensibles à la sécheresse, l'activité de certaines hydrolases comme la phosphatase ou la ribonucléase augmente avec la sécheresse (Vieira da Silva 1968 a, b et c). Or, sous l'effet d'une carence hydrique modérée, chez de jeunes plants de Tomate, la teneur en ARN diminue bien que sa synthèse mesurée par l'incorporation du <sup>32</sup>P ne soit pas particulièrement modifiée (Gates et Bonner 1959). La carence hydrique induirait donc une dégradation accrue de l'ARN cellulaire. Un phénomène semblable est observé par Kessler (1961).

Nous nous proposons de préciser les effets de la carence hydrique à la fois sur la teneur en ARN du tissu foliaire de *Gossypium*, sur la répartition de ces macromolécules dans la cellule et sur leur évolution vis-à-vis des hydrolases.

### Matériel et méthodes

#### *Matériel végétal et techniques de culture*

La variété HAR 444.2 de l'espèce *Gossypium hirsutum* L. a été cultivée en serre en milieu liquide selon les

méthodes déjà décrites (Vieira da Silva 1970). Des plants âgés de 2 mois à 2 mois et demi ont été utilisés dans nos expériences. La carence hydrique est provoquée par l'addition de polyéthylèneglycol (PEG) 600 à la solution nutritive de façon à obtenir un potentiel hydrique de — 20 joules par mole (soit — 11,1 bars). Le traitement dure habituellement 24 heures. Cependant, dans d'autres expériences, l'effet du traitement a été suivi pendant quatre jours. La perte d'eau est déterminée par rapport à la surface foliaire et exprimée en pourcentage de l'eau des tissus foliaires des témoins.

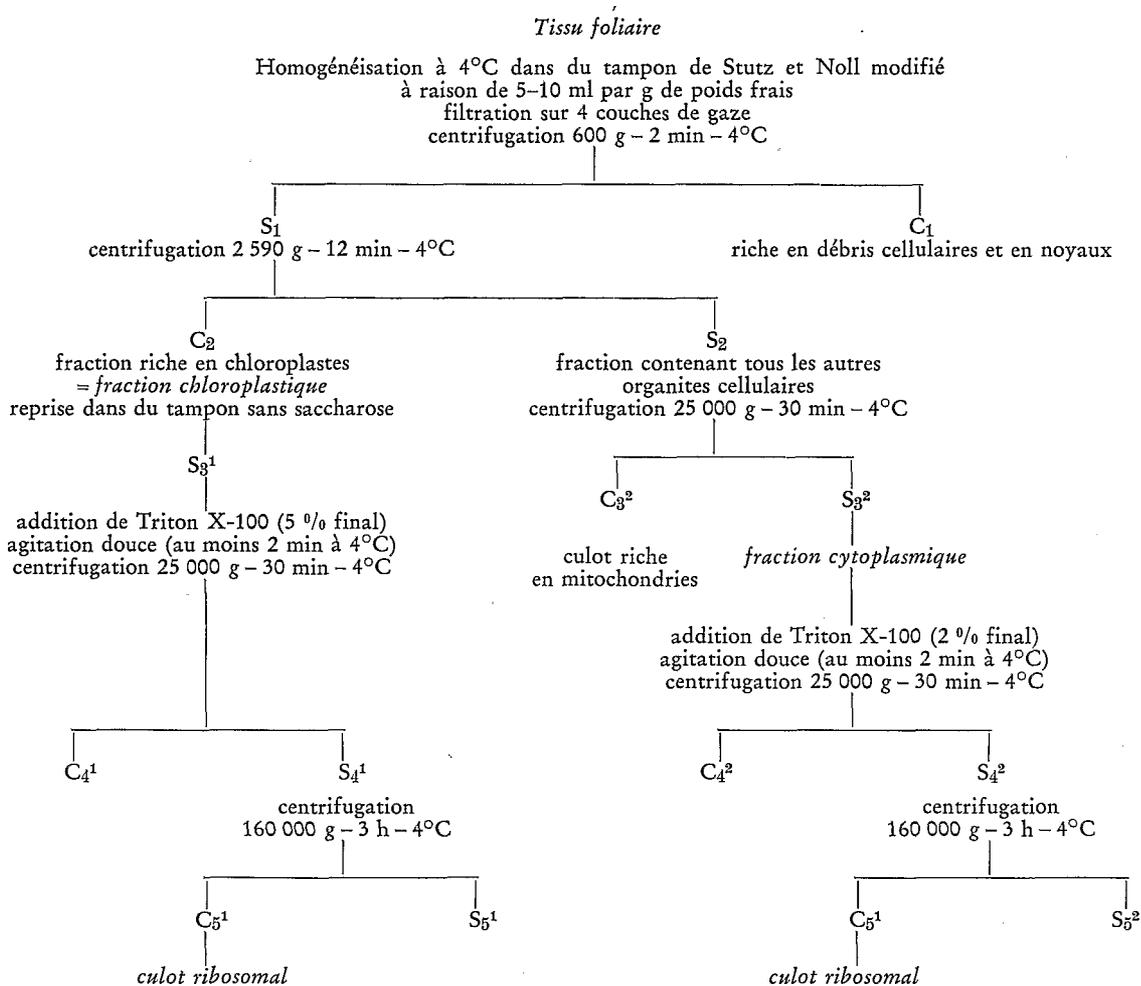
#### *Préparation des échantillons*

Seules sont récoltées les feuilles en position 2, 3 et 4 sur l'axe principal à partir du sommet. Chaque feuille prélevée est coupée selon sa nervure principale en deux moitiés équivalentes, l'une servant à doser l'activité ribonucléasique globale et l'autre à isoler les fractions cellulaires.

Le fractionnement cellulaire est effectué selon Stutz et Noll (1967). Une fraction riche en chloroplastes: la fraction dite chloroplastique, et une fraction cytoplasmique, débarassée des mitochondries, sont ainsi obtenues (Tableau 1). L'activité ribonucléasique est également déterminée sur ces deux fractions.

#### *Analyses faites*

— *Acide ribonucléique et protéines.* L'acide ribonucléique (ARN) est extrait du matériel végétal par la méthode de Nieman et Poulsen (1963). Le matériel végétal est fixé dans l'alcool absolu, soit à — 18°C pendant toute une nuit, soit bouillant pendant 2 minutes,

Tableau 1. Préparation des fractions cellulaires à partir de matériel foliaire de *Gossypium*.

Le précipité obtenu est centrifugé et lavé successivement à l'éthanol à 95°C contenant du NaCl à 10 %, à l'éthanol à 50 % acidifié à pH = 4,5, à l'acide perchlorique 0,2 N à 4°C, au mélange éthanol-ether (3 : 1 v/v) bouillant, et finalement à l'éther. Puis il est séché.

La poudre obtenue est traitée par le NaOH 0,3 N à 30°C pendant 18 heures. Le précipité est centrifugé, lavé à NaOH 0,3 N deux fois et une partie aliquote des surnageants, rassemblés et ajustés au volume exact le plus proche, est utilisée pour le dosage des protéines par la méthode de Lowry et al. (1951). Le reste est acidifié à pH = 1 en ajoutant de l'acide perchlorique à 15 % à 4°C et laissé 40 minutes à 4°C avant d'être centrifugé. Le surnageant est utilisé pour le dosage de l'ARN par la méthode à l'orcinol (Ashwell 1957). Souvent, le culot est lavé deux fois à l'acide perchlorique 0,5 N et le

liquide de lavage est ajouté au surnageant servant au dosage de l'ARN.

Les valeurs obtenues sont exprimées soit par rapport à la surface foliaire déterminée à partir d'un tracé du contour de la feuille soit par rapport aux protéines totales. La représentation par rapport à la surface foliaire a été retenue quand cela a été possible. En effet, la surface de la feuille peut en première approximation être considérée constante au cours du traitement.

— *Ribonucléase*. Une partie aliquote de chacune des fractions recueillies est utilisée pour le dosage de l'activité ribonucléasique par la méthode de Vieira da Silva (1970).

L'activité de l'enzyme est dosée spectrophotométriquement à 260 nm et exprimée directement en unités de densité optique par mg de protéines et heure.

Tableau 2. Influence de la carence hydrique sur le contenu en ARN et en protéines des feuilles de *Gossypium hirsutum*. Les quantités d'ARN sont exprimées en  $\mu\text{g}$  de pentose par  $\text{cm}^2$  de surface foliaire et les protéines en  $\text{mg}$  par  $\text{cm}^2$  de surface foliaire.

Paramètre	Total	Fraction chloroplastique $C_2$	Fraction cytoplasmique $S_3$
ARN ..... traitement osmotique ...	17,5 $\pm$ 2,20	7,3 $\pm$ 1,10	7,9 $\pm$ 0,30
témoins .....	39,2 $\pm$ 3,50	26,1 $\pm$ 4,20	8,4 $\pm$ 1,10
Protéines ... traitement osmotique ...	1,18 $\pm$ 0,21	0,76 $\pm$ 0,16	1,37 $\pm$ 0,05
témoins .....	2,80 $\pm$ 0,40	1,94 $\pm$ 0,21	0,71 $\pm$ 0,21

## Résultats

### Influence de la carence hydrique sur l'ARN foliaire total

Sous l'effet d'une carence hydrique accentuée, le potentiel de la solution nutritive étant de  $-20$  joules par mole, la teneur en ARN des feuilles de Cotonnier diminue fortement. Cette diminution est de plus de 50 % par rapport aux témoins au bout de 24 heures (Tableau 2) et ce processus se poursuit jusqu'à 96 heures, qui est le dernier stade que nous avons étudié (Figure 1). La diminution de la quantité globale d'ARN foliaire est fonction de la déshydratation provoquée par le traitement osmotique (Figure 2).

Parallèlement à cette réduction de la quantité globale d'ARN dans la feuille, l'activité totale de la ribonucléase augmente. Une liaison semble exister entre la teneur en ARN et cette augmentation de l'activité ribonucléasique. Elle a été observée dans toutes les expériences où cette activité a été dosée en même temps que la quantité globale d'ARN (Figure 3).

### Influence de la carence hydrique sur la répartition cellulaire de l'ARN foliaire

Après un traitement osmotique de 24 heures, comparé aux témoins, il ne reste plus que 28 % de l'ARN contenu dans la fraction chloroplastique. Le compartiment cytoplasmique ne semble pas être touché: il en contient encore 94,1 %. C'est donc le compartiment chloroplastique défini selon notre mode de fractionnement cellulaire qui semble le plus affecté par la carence hydrique (Tableau 2).

Dans les plants témoins, la majorité de l'ARN et des protéines cellulaires se trouvent dans le compartiment chloroplastique dans une proportion sensiblement comparable. Mais dans les plants traités l'accroissement relatif dans le compartiment cytoplasmique est plus important pour les protéines que pour l'ARN (Tableau 2).

La cinétique du processus confirme cette sensibilité particulière du compartiment chloroplastique (Figure 1 A) et souligne une légère augmentation de la teneur

en ARN du compartiment cytoplasmique pendant les 24 premières heures seulement (Figure 1 B).

Dans les chloroplastes, la proportion d'ARN ribosomal rapporté à l'ARN total contenu dans cette fraction passe de 71,3 % pour les plants témoins à 46,4 % pour les plants traités. Mais dans le cytoplasme elle

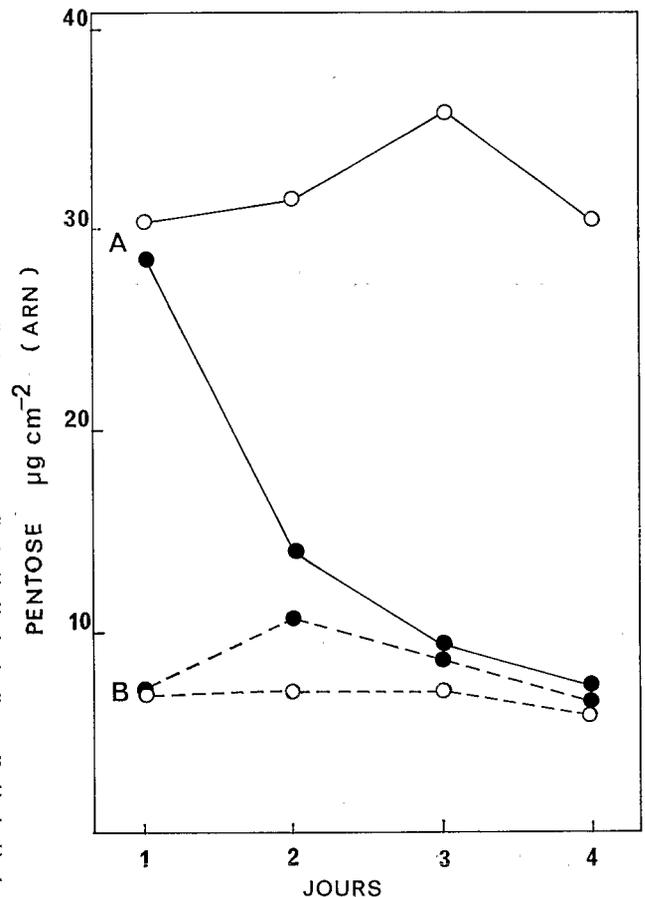


Fig. 1. Evolution de la teneur en ARN au niveau des compartiments cellulaires chloroplastique (A) et cytoplasmique (B) au cours d'un cycle de sécheresse de 4 jours. (○) témoin; (●) traitement osmotique.

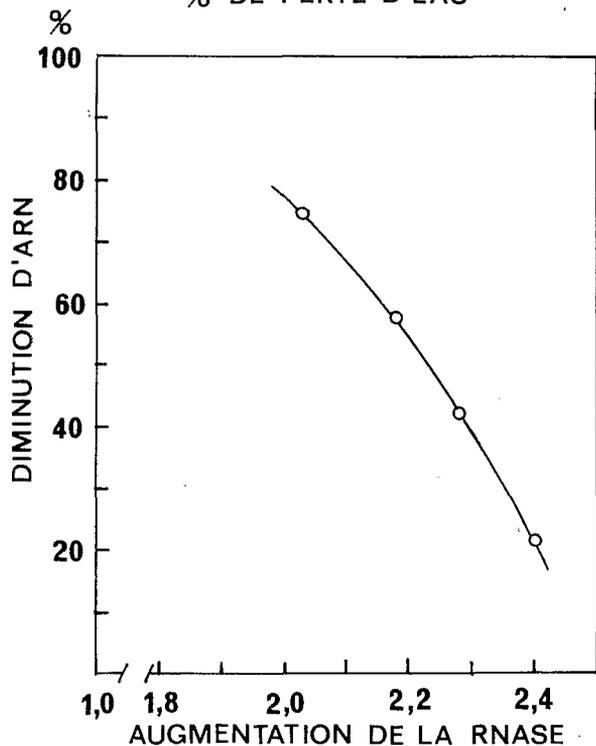
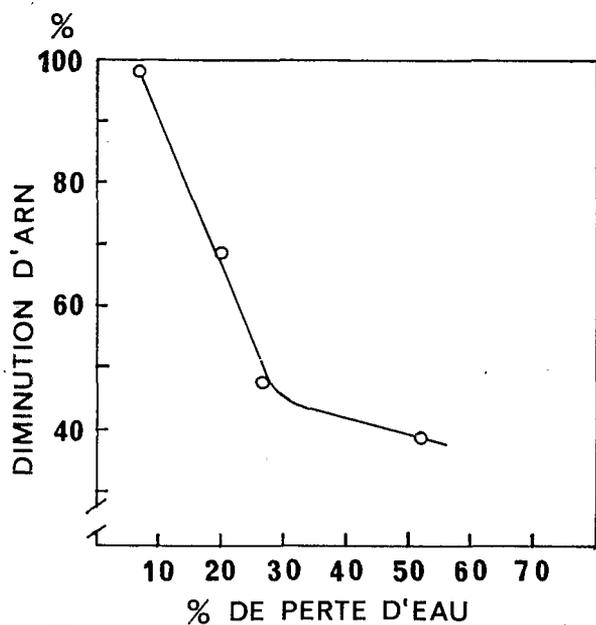


Fig. 2 (en haut). Pourcentage d'ARN par rapport au témoin suivant l'intensité des pertes d'eau foliaire.

Fig. 3 (en bas). Pourcentage d'ARN par rapport au témoin suivant la valeur de l'augmentation de l'activité de la ribonucléase.

n'est pas sensiblement modifiée (Tableau 3). Au cours d'une carence hydrique accentuée ce qui est le plus

Tableau 3. Influence de la carence hydrique sur le pourcentage de l'ARN ribosomal par rapport à l'ARN total dans les fractions chloroplastique et cytoplasmique des feuilles de *Gossypium hirsutum*.

Fraction	Pourcentage de l'ARN ribosomal	
	Plantes traitées	Plantes témoins
Chloroplastique (C <sub>2</sub> ) . . . . .	46,4	71,3
Cytoplasmique (S <sub>3</sub> <sup>2</sup> ) . . . . .	61,6	57,7

modifié du point de vue de l'ARN dans le compartiment chloroplastique c'est la teneur en ARN ribosomal.

La figure 4 rend compte du résultat d'autres expériences où la distribution de l'ARN dans la cellule est fonction de la perte d'eau des tissus foliaires. Comparée aux témoins, la teneur en ARN des deux compartiments chloroplastique et cytoplasmique, diminue jusqu'à une perte de 30 % d'eau par rapport aux témoins (Figure 4). Le compartiment cytoplasmique arrive même à s'enrichir en ARN et plus particulièrement en ARN ribosomal. Une partie de l'ARN ribosomal chloroplastique semble ainsi se retrouver dans ce compartiment.

### Discussion

Les tissus foliaires du Cotonnier réagissent de la même façon que les feuilles de plantules de Tomate (Gates et Bonner 1959) ou les feuilles adultes de Betterave (Shah et Loomis 1965): un déficit hydrique accentué se traduit par une diminution importante de la teneur en ARN.

Cette réduction du contenu global en ARN est associée à une augmentation des activités ribonucléasiques. Une telle relation entre la teneur en ARN et l'activité ribonucléasique a été esquissée pour les feuilles en développement (Kessler et Engelberg 1962) et les feuilles de plantules de Blé (Hadziyev, Mehta et Zalik 1969), et cette situation est caractéristique des conditions d'agression (Bagi et Farkas 1967, Dove 1967, McHale et Dove 1968, Udvardy 1969). Pour le Cotonnier, une liaison entre l'augmentation de l'activité ribonucléasique et une diminution de la quantité de matière sèche avait été trouvée (Vieira da Silva 1968 a).

Si une augmentation de l'activité de la ribonucléase est en rapport avec la diminution de la teneur en ARN de la feuille, elle affecte essentiellement le compartiment chloroplastique, ce qui modifie profondément la répartition de l'ARN cellulaire, la ribonucléase dégradant plus particulièrement l'ARN ribosomal chloroplastique. Une telle altération avait été notée sur des plants de Betterave soumis à la sécheresse (Shah et Loomis 1965) mais c'est la fraction soluble cytoplasmique qui s'enrichit aux dépens de l'ARN ribosomal cytoplasmique et de l'ARN contenu dans la fraction insoluble constituée par les noyaux, les mitochondries et les chloroplastes. Pour une

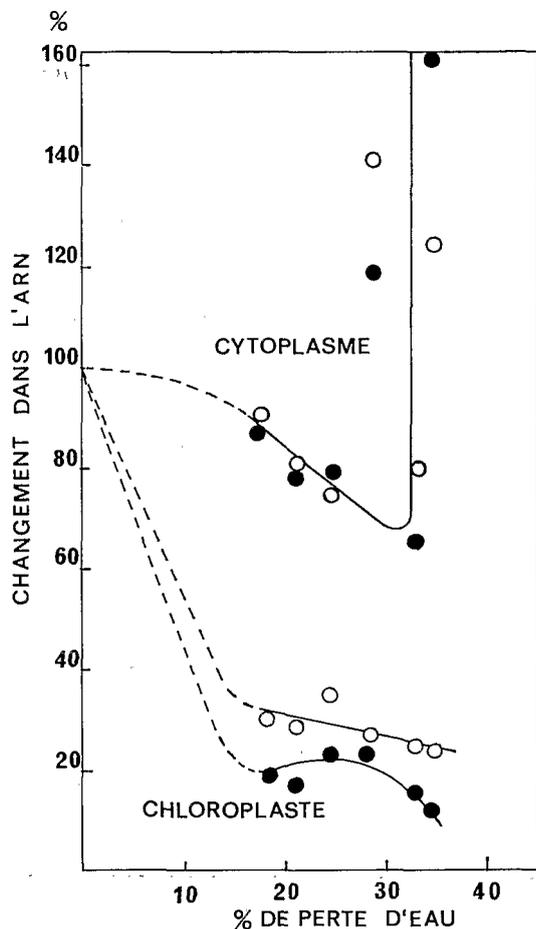


Fig. 4. Influence de la perte d'eau foliaire sur l'évolution de la teneur en ARN des compartiments chloroplastique et cytoplasmique. ○ ARN total; (●) ARN ribosomal.

carence hydrique prononcée, une telle situation est rencontrée aussi chez le Cotonnier. Ainsi, dans une première phase, la ribonucléase augmente dans les chloroplastes, le contenu en ARN de cette fraction diminue et l'ARN ribosomal plus particulièrement. Puis dans une seconde phase, la ribonucléase se retrouvant aussi dans le cytoplasme, ce compartiment se vide à son tour de son ARN.

L'enrichissement du cytoplasme en ARN peut être le résultat d'une modification des structures chloroplastiques qui seraient alors plus perméables à l'ARN et à la ribonucléase. En effet, les chloroplastes soumis à une hypertonicité perdent leurs ribosomes qui se retrouvent dans le milieu extérieur (Filippovitch et al. 1967). Mais, un tel phénomène peut correspondre aussi à une destruction de ces chloroplastes bien que la chlorophylle ne se retrouve pas dans le compartiment cytoplasmique. Il a déjà été observé que la déshydratation entraîne une modification de la structure des plastides des racines de

Maïs (Nir et al. 1969), où les plastides se sont arrondis, et ont perdu leurs structures membranaires internes, et leur stroma est moins opaque aux électrons.

La sensibilité de l'ARN ribosomal aux ribonucléases n'est pas spécifique du matériel ici étudié. Pour les feuilles de plantules de Blé, une augmentation de l'activité ribonucléasique est aussi associée à une diminution de la teneur en ARN ribosomal (Hadziyev et al. 1969). Pour le Maïs, l'ARN ribosomal est dégradé préférentiellement du fait même de la localisation de la ribonucléase (Hsiao 1968). Chez le Radis, l'ARN ribosomal chloroplastique est particulièrement labile (Ingle 1968). Et cet enrichissement observé du compartiment cytoplasmique en ARN ribosomal peut n'être que la conséquence d'une plus grande résistance des ribosomes cytoplasmiques à la ribonucléase (Ingle et al. 1970, Vedel et D'Aoust 1970).

Il existe une certaine analogie entre la carence hydrique et la sénescence foliaire, des résultats comparables ayant été obtenus (Woolhouse 1967). Sissakyan et Odintzova (1956) notent qu'au cours de la sénescence les chloroplastes sont les premiers organites touchés aussi bien au niveau des protéines que des acides nucléiques.

La sénescence a été très étudiée sur des feuilles excisées: au cours du vieillissement, tous les ARN ne sont pas affectés de la même façon, la cessation de la synthèse de l'ARN messager s'accompagne d'une dégradation accrue des ribosomes (Parthier 1964, Wollghien et Parthier 1964). Certains auteurs vont jusqu'à assimiler l'influence de la carence hydrique à une accélération de la sénescence (Shah et Loomis 1965, Ben-Zioni, Itai et Vaadia 1967). Les résultats ici présentés pourraient confirmer cette hypothèse.

### Bibliographie

- Ashwell, G. 1957. Colorimetric analysis of sugars. — *In* Methods in Enzymology (S. P. Colowick and N. O. Kaplan, Ed.) 3: 73-105. Academic Press.
- Bagi, G. & Farkas, G. L. 1967. On the nature of increase in ribonuclease activity in mechanically damaged tobacco leaf tissues. — *Phytochemistry* 6: 161-169.
- Ben-Zioni, A., Itai, C. & Vaadia, Y. 1967. Water and salt stresses, kinetin and protein synthesis in tobacco leaves. — *Plant Physiol.* 42: 361-365.
- Dove, L. D. 1967. Ribonuclease activity of stressed tomato leaflets. — *Ibid.* 42: 361-365.
- Filippovitch, I. I., Spandaryan, O. A., Svetailo, E. N. & Sissakyan, N. M. 1967. State of ribosomes in chloroplasts. — *Dokl. Akad. Nauk. S.S.S.R.* 172: 1214-1217.
- Gates, C. T. & Bonner, J. 1959. The response of the young tomato plant to a brief period of water shortage. IV. Effects of water stress on the ribonucleic acid metabolism of tomato leaves. — *Plant Physiol.* 34: 49-55.
- Hadziyev, D., Mehta, S. L. & Zalik, S. 1969. Nucleic acids and ribonucleases of wheat leaves and chloroplasts. — *Can. J. Biochem.* 47: 272-282.
- Hsiao, T. C. 1968. Ribonuclease activity associated with ribosomes of *Zea mays*. — *Plant Physiol.* 43: 1355-1361.
- Ingle, J. 1968. Synthesis and stability of chloroplast ribosomal RNAs. — *Ibid.* 43: 1448-1454.
- Possingham, J. W., Wells, R., Leaver, C. J. & Loening, U. E. 1970. The properties of chloroplast ribosomal RNA.

- *In Symp. Soc. Exp. Biol.*: XXIV — Control of organelle development (P. L. Miller, Ed.), pp. 303-325. Cambridge Univ. Press.
- Kessler, B. 1961. Nucleic acids as factors in drought resistance of plants. — *In Recent Adv. Bot.* 2: 1153-1159.
- Engelberg, N. 1962. Ribonucleic acid and ribonuclease activity in developing leaves. — *Biochim. Biophys. Acta* 55: 70-82.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. & Randall, R. J. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. — *J. Biol. Chem.* 193: 265-274.
- McHale, J. S. & Dove, L. D. 1968. Ribonuclease activity in tomato leaves as related to development and senescence. — *New Phytol.* 67: 505-515.
- Nieman, R. H. & Poulsen, L. L. 1963. Spectrophotometric estimation of nucleic acid of plant leaves. — *Plant Physiol.* 38: 31-35.
- Nir, I., Klein, S. & Poljakoff-Mayber, A. 1969. Effect of moisture stress on submicroscopic structure of maize roots. — *Aust. J. Biol. Sci.* 22: 17-33.
- Parthier, B. 1964. Proteinsynthese in grünen Blättern. II. Aminosäureinkorporation in die Proteine subzellulärer Strukturen in Abhängigkeit vom physiologischen Zustand der Blätter (Blattalter). — *Flora* 154: 230-244.
- Shah, C. B. & Loomis, R. S. 1965. Ribonucleic acid and protein metabolism in sugar beet during drought. — *Physiol. Plant.* 18: 240-254.
- Sissakyan, N. M. & Odintzova, M. S. 1956. Ribonucleic acid of plastids and its changes during the ontogeny of the plant. — *Biokhimiya* 21: 577-584.
- Stutz, E. & Noll, H. 1967. Characterization of cytoplasmic and chloroplast polysomes in plants: Evidence for three classes of ribosomal RNA in nature. — *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.* 57: 774-778.
- Udvardy, J., Farkas, G. L. & Marré, E. 1969. On RNase and other hydrolytic enzymes in excised *Avena* leaf tissues. — *Plant Cell Physiol.* 10: 375-386.
- Vedel, F. & D'Aoust, M. J. 1970. Polyacrylamide gel analysis of high molecular weight ribonucleic acid from etiolated and green cucumber cotyledons. — *Plant Physiol.* 46: 81-85.
- Vieira da Silva, J. B. 1968 a. Influence du potentiel osmotique du milieu de culture sur l'activité de la ribonucléase dans trois espèces de *Gossypium*. — *C.R. Acad. Sci. (Paris)* 266(D): 2412-2415.
- 1968 b. Le potentiel osmotique du milieu de culture et l'activité soluble et latente de la phosphatase acide dans le *Gossypium thurberi*. — *Ibid.* 267(D): 729-732.
- 1968 c. Influence du potentiel osmotique de la solution nutritive sur la teneur en glucides solubles et amidon de trois espèces de *Gossypium*. — *Ibid.* 267(D): 1289-1292.
- 1970. Contribution à l'étude de la résistance à la sécheresse dans le genre *Gossypium*. II. La variation de quelques activités enzymatiques. — *Physiol. Vég.* 8: 413-447.
- Wollghien, R. & Parthier, B. 1964. Der Einfluss des Kinetins auf den RNS- und Proteinstoffwechsel in abgeschnittenen, mit Hemmstoffen behandelten Tabakblättern. — *Phytochemistry* 3: 241-248.
- Woolhouse, H. W. 1967. The nature of senescence in plants. — *In Symp. Soc. Exp. Biol.*: XXI — Aspects of the Biology of Ageing (Woolhouse, H. W., Ed.), pp. 179-213. Cambridge Univ. Press.