

BIOLOGIE MOLÉCULAIRE. — *Stimulation de l'induction — ou inhibition du développement — des tumeurs de Crown-gall par des ARN-fragments U₂. Interférence de l'auxine.* Note (*) de Liliane Le Goff et Mirko Beljanski, présentée par Pierre-Paul Grassé.

Les ARN-fragments U₂ obtenus par l'action ménagée de la RNase U₂ sur des ARN ribosomiques riches en nucléotides A et G exercent, selon le moment où ils sont ajoutés à la blessure infectée par *Agrobacterium tumefaciens* B₆, soit une action stimulante sur l'induction des tumeurs de Crown-gall soit une action inhibitrice sur leur développement ultérieur. Les résultats obtenus *in vitro* et *in vivo* démontrent une interaction entre l'auxine et ces ARN-fragments se répercutant sur l'apparition ou la prolifération des cellules tumorales.

RNA-fragments U₂ obtained by mild degradation with RNase U₂ of ribosomal RNA containing A and G nucleotides in excess are capable of exhibiting either a stimulatory effect on the induction of Crown-gall tumors or an inhibitory action on their subsequent development. These different effects are dependent on the moment at which RNA-fragments were introduced into wounded Pea seedlings infected by *Agrobacterium tumefaciens* B₆. The results obtained *in vitro* and *in vivo* suggest that an interaction between auxin and RNA-fragments U₂ may take place, either increasing the tumor induction or inhibiting the proliferation of tumorous cells.

Nous avons montré (1) que la dégradation des ARN ribosomiques par la RNase pancréatique permet d'obtenir des fragments qui, *in vivo* et en l'absence de bactéries, induisent l'apparition des tumeurs végétales par synergie avec les auxines de la plante. Ces fragments d'ARN, non transcrits en ADN complémentaire (2), interviennent *in vitro* pour modifier l'expression du pouvoir oncogène d'*Agrobacterium tumefaciens* (3). Les mêmes ARN ribosomiques en présence de RNase U₂ fournissent des ARN-fragments U₂ qui *in vitro* peuvent être transcrits en ADN complémentaire (4). Chez le Pois, ils exercent en présence d'*A. tumefaciens* une spectaculaire action au cours de l'apparition des cellules cancéreuses et lors de la prolifération de ces dernières.

MATÉRIEL ET MÉTHODES. — Le matériel végétal est l'épicotyle décapité du Pois nain *Pisum sativum* L. cv. Annonay (5). Le « poids moyen ajusté » (6) des tumeurs excisées 12 jours après inoculation d'*A. tumefaciens* B₆ (5.10⁷ bactéries/plaie) permet une étude quantitative de la tumorigenèse.

Les ARN-fragments U₂, dialysés contre H₂O et stérilisés, sont soit mélangés aux bactéries au moment de l'infection de la blessure du Pois (T₀) soit déposés sur celle-ci aux jours 1, 4 ou 8 à la faveur d'une scarification.

TABLEAU

Effet des ARN-fragments U₂
sur l'induction et le développement des tumeurs de Pois en présence d'*A. tumefaciens* B₆

| Traitement | Temps entre l'infection par B ₆ des tiges décapitées (T ₀) et le traitement | | | |
|---|---|----------|----------|----------|
| | 0 | 24 h | 4 jours | 8 jours |
| Témoin : eau distillée..... | 100 ± 10 | 100 ± 10 | 100 ± 12 | 100 ± 16 |
| ARN-fragments U ₂ 80 µg/plaie..... | 185 ± 15 | 111 ± 12 | 59 ± 11 | 53 ± 9 |

Résultats exprimés en valeurs relatives par rapport aux témoins de la moyenne des poids ajustés des tumeurs calculés au niveau de probabilité P = 0,01. Durée des expériences, 12 jours. Nombre d'échantillons dans chaque expérience, 24 à 30. Les résultats représentent la moyenne de 4 séries d'expériences indépendantes.

RÉSULTATS. — Inoculés en même temps que les bactéries (T_0), les ARN-fragments U_2 augmentent fortement le poids des tumeurs alors qu'ils sont sans action lorsque déposés 24 h après l'infection par B_6 (tableau). Aux jours 4 ou 8 ces ARN-fragments provoquent non seulement une inhibition substantielle de la prolifération des tumeurs (tableau) mais même une nécrose. Or ces ARN-fragments U_2 utilisés seuls en l'absence d'*A. tumefaciens* n'ont aucune action oncogène ou toxique sur la plante. Les effets varient selon la concentration en ARN-fragments U_2 ; l'effet inhibiteur est le même qu'ils soient

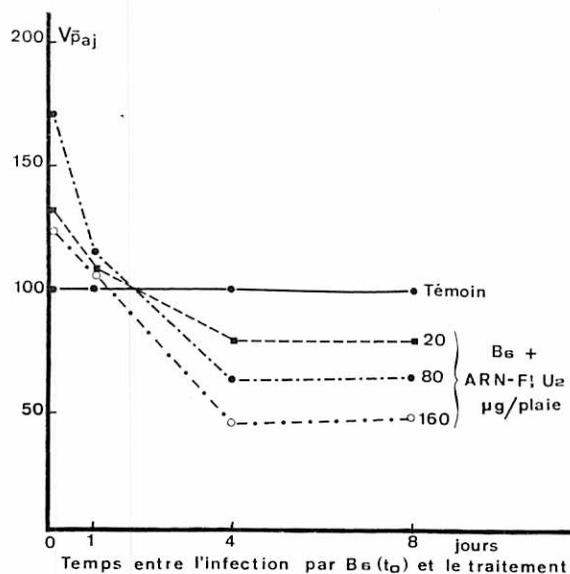


Fig. 1

Fig. 1. — Effet de différentes concentrations en ARN-fragments U_2 dans la cancérisation du Pois par *A. tumefaciens* B_6 (ordonnée, valeurs relatives de la moyenne des poids ajustés des tumeurs; abscisse, temps entre l'infection par B_6 (T_0) et le traitement).

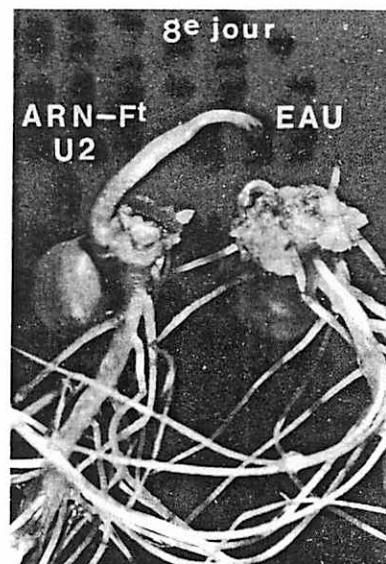


Fig. 2

Fig. 2. — Nécrose par les ARN-fragments U_2 des tissus tumoraux de Pois induits par *A. tumefaciens* B_6 .

ajoutés au 4^e ou au 8^e jour du développement des tumeurs (fig. 1) et une nécrose très nette s'observe là où ils agissent comme inhibiteurs (fig. 2). Blesser les cellules périphériques d'une tumeur végétale provoque une légère nécrose de loin moindre que celle observée en présence d'ARN-fragments U_2 ; au-delà (18 jours) du terme normal (12 jours) la nécrose des tissus s'étend dans 100 % des cas contre 17 % chez les témoins. La difficile pénétration des produits dans les tissus tumoraux très turgescents explique la nécrose importante mais non totale des tumeurs.

La transformation de cellules saines en tumorales nécessite une concentration optimale d'auxine [(¹), (⁷), (⁸)]. La relation hormones végétales-ARN chez les tissus sains [(⁹), (¹⁰)] ne fut pas interprétée lors des processus de la cancérisation de ces derniers (¹¹). Une molécule d'acide indolylacétique (AIA) peut se fixer à un ARN de transfert (\pm 80 nucléotides) et non à des ARN ribosomiques intacts (¹²). L'AIA et les ARN-fragments U_2 (60-70 nucléotides) furent inoculés seuls ou simultanément, soit au moment de l'infection de la plaie par B_6 (T_0) soit aux jours 4 ou 8. Une interaction indiscutable entre auxine et ARN-fragments U_2 se produit (fig. 3) : lorsque leur inoculation est concomitante de celle des bactéries (T_0) les effets forts stimulateurs de chacun d'eux sont diminués s'ils

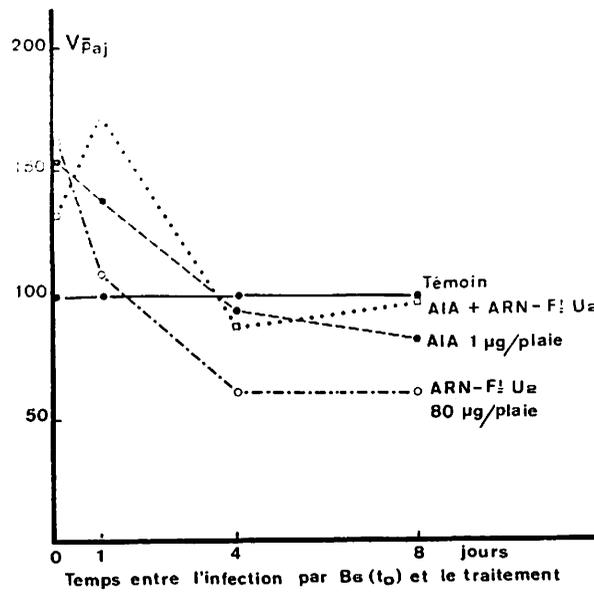


Fig. 3. — Interaction entre ARN-fragments U_2 et AIA dans l'apparition et le développement des tumeurs de Crown-gall (*ordonnée et abscisse, voir fig. 1*). Note : les produits aux doses employées interviennent peu (AIA) ou pas (ARN-fragments U_2) dans le développement des bourgeons sous-jacents à la plaie d'inoculation. Toute action même faible est cependant annihilée par le calcul du poids ajusté des tumeurs, poids correspondant à une longueur nulle des rameaux axillaires.

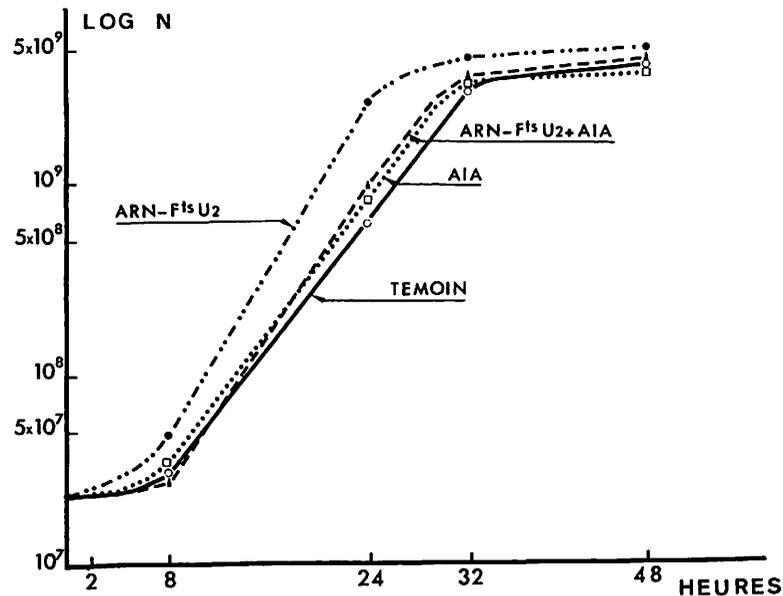


Fig. 4. — Croissance en milieu synthétique (15) d'*A. tumefaciens* B_6 en absence et en présence d'ARN-fragments U_2 (50 µg/ml) et d'AIA (0,6 µg/ml) (*ordonnée, bactéries viables par millilitre de culture; abscisse, durée des cultures bactériennes*).

sont associés; l'inhibition importante de la prolifération des tumeurs observée quand les ARN-fragments U_2 seuls sont ajoutés au 4^e ou au 8^e jour disparaît si l'AIA a été ajoutée avec ces ARN-fragments U_2 . L'effet de l'AIA seul est renforcé lorsque les deux substances sont déposées ensemble 24 h après les bactéries. L'association ARN-fragments

U₂-AIA pourrait donc réguler l'activité de systèmes enzymatiques (auxine-oxydases, RNases) se traduisant à T₀ par une concentration idéale d'AIA indispensable à l'induction tumorale mais plus tard (4 et 8 jours) aboutissant à l'arrêt du développement des tumeurs. Cette compétition est confirmée par la levée d'inhibition en présence d'AIA exogène. La captation d'auxine par les ARN-fragments U₂ pourrait constituer un des facteurs responsables de l'arrêt de la prolifération des cellules cancéreuses. En effet, l'AIA agit sur l'activité ribonucléasique des cellules saines ⁽¹³⁾ et *a fortiori* sur celle des cellules cancéreuses : la RNase de ces dernières étant différente de celle des cellules saines ⁽¹⁴⁾ ceci peut engendrer des ARN-fragments de type U₂, inhibiteurs. Afin de corroborer *in vitro* l'interaction auxine-ARN-fragments U₂, nous avons montré qu'en l'absence d'AIA exogène les ARN-fragments U₂ stimulent la croissance d'*A. tumefaciens*, effet qui s'estompe lorsque le milieu de culture est additionné d'AIA (fig. 4).

Les faits relatés sont caractéristiques des ARN-fragments U₂, les fragments obtenus par la RNase pancréatique ⁽²⁾ s'avèrent au contraire capables d'induire ⁽¹⁾, ⁽³⁾ l'apparition des tumeurs en l'absence d'*Agrobacterium*. Le fait que ces derniers ARN-fragments, inducteurs, n'exercent leur action *qu'en présence d'hormone*, est une preuve supplémentaire de l'interaction entre auxine et ARN-fragments. Les ARN ribosomiques purifiés et intacts sont inertes. L'importance fondamentale des séquences nucléotidiques des ARN-fragments selon la nucléase dégradant les ARN ribosomiques est mise en évidence et suggère leurs rôles respectifs dans la formation ou la nécrose de cellules cancéreuses.

CONCLUSION. — Les ARN-fragments U₂, non toxiques pour la plante hôte et pour les bactéries, favorisent la cancérisation des cellules saines exclusivement lorsqu'ils sont ajoutés à la blessure en même temps que les bactéries. Par contre ces mêmes ARN-fragments inhibent la prolifération des cellules tumorales une fois celles-ci formées. Les effets semblent être dus à l'interaction des hormones avec ces ARN-fragments qui, selon leur nature ou leur état d'intégrité, moduleraient la disponibilité hormonale ou leur action propre et par voie de conséquence l'évolution tumorale. L'étude des mécanismes intimes des petits ARN dans la tumorigénèse des plantes se poursuit.

(*) Remise le 8 mai 1978, acceptée après révision le 27 novembre 1978.

⁽¹⁾ M. BELJANSKI et M. I. AARON-DA CUNHA, *Mol. Biol. Reports*, 2, 1976, p. 497.

⁽²⁾ M. BELJANSKI, M. BELJANSKI, M. PLAWECKI et P. BOURGAREL, *Comptes rendus*, 280, série D, 1975, p. 363.

⁽³⁾ L. LE GOFF, *Thèse de Doctorat d'État*, Université Pierre-et-Marie-Curie, Paris, 1977.

⁽⁴⁾ M. BELJANSKI, P. BOURGAREL et M. BELJANSKI, *Comptes rendus*, 286, série D, 1978, p. 1825.

⁽⁵⁾ P. MANIGAULT et A. KURKDJIAN, *Comptes rendus*, 264, série D, 1967, p. 2304.

⁽⁶⁾ P. MANIGAULT, *Ann. Inst. Pasteur*, 119, 1970, p. 347.

⁽⁷⁾ A. KURKDJIAN, P. MANIGAULT et R. E. BEARDSLEY, *Can. J. Bot.*, 53, 1975, p. 3002.

⁽⁸⁾ L. LE GOFF, M. I. AARON-DA CUNHA et M. BELJANSKI, *Can. J. Microbiol.*, 22, 1976, p. 694.

⁽⁹⁾ A. TRAWAVAS, *Prog. in Phytochem.*, 1, 1968, p. 113.

⁽¹⁰⁾ J. V. JACOBSEN, *Ann. Rev. Plant. Physiol.*, 28, 1977, p. 537.

⁽¹¹⁾ L. SEQUEIRA, *Ann. Rev. Plant. Physiol.*, 24, 1973, p. 353.

⁽¹²⁾ F. E. BENDANA, A. W. GALSTON, R. KAUR-SAWHNEY et P. J. PENNY, *Plant Physiol.*, 40, 1965, p. 977.

⁽¹³⁾ J. C. SHANNON, J. B. HANSON et C. M. WILSON, *Plant Physiol.*, 39, 1964, p. 804.

⁽¹⁴⁾ K. K. REDDI, *Proc. Nat. Acad. Sc., U.S.A.*, 56, 1966, p. 1207.

⁽¹⁵⁾ P. MANIGAULT et Ch. STOLL, *Phytopathol. Z.*, 38, 1960, p. 1.

Laboratoire de Pharmacodynamie, Faculté de Pharmacie,
rue Jean-Baptiste-Clément, 92290 Châtenay-Malabry.