

**mode d'action de la température
sur la multiplication du virus
de la mosaïque du tabac :
étude *in vivo* de la synthèse de ses constituants**

M. WURTZ

Le mode d'action de la température sur la multiplication de la souche commune du Virus de la Mosaïque du Tabac et d'une souche mutante thermophile est étudié à l'aide de marquages courts au ^{32}P , au ^{14}C ou au ^{35}S .

Des expériences, utilisant des techniques de double marquage, ont montré que le transfert de disques de Tabac virosés en survie à la température non optimale de développement pour la souche considérée, entraîne une perturbation dans l'incorporation du ^{32}P dans le RNA viral. Il faut attendre une dizaine d'heures après l'inhibition de la synthèse de RNA viral pour observer une diminution de l'incorporation de la ^{14}C proline, de ^{35}S dans la protéine capsidaire, dans les mêmes conditions expérimentales.

Ces résultats seraient en faveur d'une relative stabilité du RNA messager viral pouvant alors induire la synthèse d'un nombre important d'unités protéiques capsidaires.

The effect of temperature on the multiplication of the common strain of TMV and of a thermophilic mutant strain has been studied by short incubations with ^{32}P and ^{14}C proline or ^{35}S . Transferring the inoculated discs to a non optimal temperature caused a disturbance of the viral RNA replication.

Incorporation of ^{14}C proline or ^{35}S into capsid protein decreased about 9 hours after incorporation of ^{32}P in the viral RNA was depressed.

These results seem to indicate a relative stability of the viral messenger RNA, which could induce the synthesis of an important number of protein subunits under these conditions.

Le virus de la mosaïque du tabac VMT (photographies 1-2) représente un matériel de choix pour l'étude de nombreux problèmes de Virologie. Certains aspects de sa multiplication et plus particulièrement ceux de la replication de son acide ribonucléique (RNA) sont encore mal connus.

Le cycle de développement d'un virus à RNA comprend plusieurs étapes qui sont essentiellement :

- *La décapsidation* : le virus perd son enveloppe protéique et le RNA est libéré dans la cellule hôte.
- *La biosynthèse de protéines précoces* : le RNA libéré va jouer le rôle de RNA messager pour coder le système enzymatique permettant sa replication (RNA replicase virale).
- *La formation et le fonctionnement d'un RNA à double brin* : forme reproductrice donnant naissance au RNA néoformé.
- *La biosynthèse des unités de structure protéique* : le RNA néoformé joue le rôle de RNA messager pour cette protéine.
- et finalement *la morphogénèse virale* : RNA néoformé et protéine capsidaires s'assemblent pour donner de nouveaux virions.

Ces derniers points ont été très peu étudiés *in vivo* dans le cas des virus de plantes du fait qu'il n'est pas possible d'avoir des cycles uniques et synchrones de multiplication du virus. L'utilisation des éléments radioactifs nous a permis de tourner cette difficulté. En effet, elle permet de déceler des quantités très faibles de substances et, en utilisant des marquages courts ou "pulses", il est possible d'avoir à un instant donné, une image des synthèses des constituants du virus.

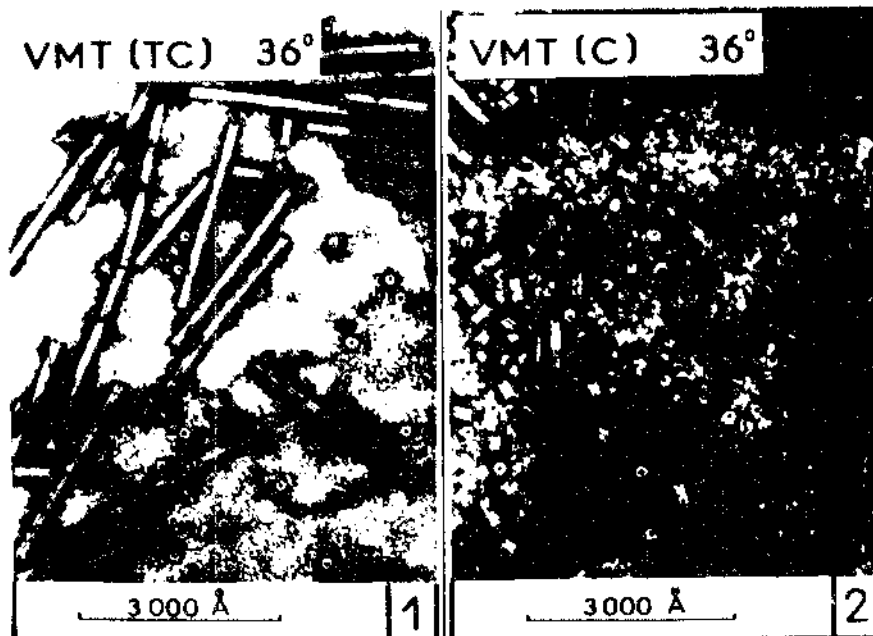
Depuis de nombreuses années, le laboratoire a essayé d'aborder certaines de ces questions en utilisant l'action de la température sur la multiplication du VMT. Après qu'ait été établie par LEBEURIER et DAORF la cinétique de la multiplication de la souche commune du VMT (rendement maximum à 24°), il a été montré que l'action inhibitrice des températures infra et supraoptimales n'est pas seulement le résultat d'une action sur le métabolisme de la cellule hôte, mais d'une influence directe sur le développement du virus (on note une accumulation des capsides aux températures supraoptimales). De plus, l'isolement d'une souche thermophile VMT-TC (photographie 1) a permis de confirmer les faits qui viennent d'être rapportés (rendement maximum à 36°).

Ils permettent d'imaginer que dans les conditions optimales de développement, la replication du RNA et la synthèse des protéines capsidaires sont telles que tout le RNA formé est encapsidé. Quand la température n'est plus optimale, peu de molécules de RNA sont synthétisées alors que la biosynthèse des unités de structure protéique continue à un certain rythme (photographie 2), les unités en surnombre s'accumulant sous une forme plus ou moins agrégée.

C'est ce que nous allons vérifier en étudiant l'incorporation de ^{32}P dans le RNA viral, de ^{14}C proline ou ^{35}S dans la protéine capsidaire.

Méthodes (Voir schéma expérimental)

Virus : - *Souche commune du VMT* : VMT (C) multiplié sur *N. tabacum* var. Judy Pride à 24°, purifié par centrifugations différentielles.



PHOTOGRAPHIE 1 :

Cliché de microscopie électronique d'une suspension purifiée de Virus de la Mosaïque du Tabac souche thermophile VMT (TC) provenant de disques de Tabac virosés maintenus en survie à 36°.

Coloration : Formiate d'uranyle à 1%.

PHOTOGRAPHIE 2 :

Cliché obtenu dans les mêmes conditions expérimentales avec la souche commune VMT (C).

- *Souche thermophile* : VMT (TC) issue d'un clonage de souche VMT (LB) (LEBEURIER et HIRTH), multiplié à 36° sur *N. tabacum* var. Judy Pride, dont les propriétés ont été décrites par LEBEURIER et WURTZ.

Inoculation, survie et marquage des disques de feuille

Des disques de 45 mm, prélevés dans des feuilles de *N. tabacum* var. Judy Pride sont inoculés à l'aide de suspensions purifiées de chaque souche de virus (1 mg/ml) en présence de célite et sont mis en survie suivant la technique de VICKERY et al.

Les disques provenant de la partie droite des feuilles donnent le lot traité et ceux de la partie gauche le lot témoin, ils sont tous deux laissés pendant 48 heures à la température optimale de multiplication de la souche de VMT considérée : 24° pour VMT (C) et 36° pour VMT (TC). Le lot témoin étant maintenu à ces températures, le lot traité est alors transféré à 36° ou 20° pendant une durée de 1 à 30 heures.

Après le temps de transfert choisi, les disques sont récoltés et mis en présence de 40 ml de milieu d'incubation (Knop 1/3 sans phosphates à raison de 30 µCi/ml de $^{32}\text{P}\text{O}_4\text{H}_3$, de 1,5 µCi/ml de ^{14}C proline ou de 10 µCi/ml ^{35}S), pendant une durée de 30 mn. Après incubation, les disques sont prélevés, et séchés puis congelés à -20°.

Estimation de l'incorporation du ^{32}P , de la ^{14}C proline ou du ^{35}S dans RNA et protéines.

- Cas de l'antigène viral

Les disques broyés en présence de tampon phosphate 0,01 M, NaCl 0,9 % pH 7,0 sont centrifugés 10 mn à 3 000 g, puis 40 mn à 20 000 g donnant un extrait brut dont on évalue la concentration en antigène viral par la technique de LOWRY et al.

Une fraction aliquote de cet extrait brut (3 ml) est mise en présence de 0,9 ml de sérum anti-VMT (quantité suffisante pour précipiter entièrement plus de 3 mg d'antigène viral). Après 20 h à + 4°, le précipité sérologique obtenu est lavé 3 fois avec 3 ml de tampon de broyage pour éliminer les éléments radio-actifs qui auraient pu s'y adsorber. Les contrôles que nous avons effectués ont confirmé la nécessité de procéder soigneusement à de tels lavages.

Les précipités ainsi lavés, sont alors repris dans 1 ml d'alcool éthylique absolu, puis dissous dans 0,5 ml d'hyamine et placés dans 10 ml de liquide scintillateur (5,5 g PPO/l).

Après avoir corrigé les activités ainsi obtenues en tenant compte du recouvrement des spectres d'émission du ^{32}P , du ^{14}C ou du ^{35}S , les résultats sont calculés en CPM/mg d'antigène viral.

- Cas du RNA total

Pour interpréter certains résultats obtenus pour l'incorporation du ^{32}P dans le RNA viral pour montrer la non incorporation de la ^{14}C proline dans les RNA, nous avons extrait les RNA totaux de disques de feuilles sains ou

virosés maintenus dans les mêmes conditions expérimentales que précédemment. L'extraction se fait suivant la technique de GIERER et al, adaptée par PINCK et al à notre matériel.

- Cas des protéines solubles

Nous avons également étudié l'incorporation spécifique de ^{14}C proline ou de ^{35}S dans les protéines solubles extraites par précipitation au TCA 5 % final.

Tous les résultats expérimentaux sont exprimés sous la forme de graphiques représentant les variations du rapport \underline{R} en fonction de la durée du transfert.

$$\underline{R} = \frac{\text{activité spécifique de l'échantillon transféré}}{\text{activité spécifique de l'échantillon témoin}}$$

Le calcul de \underline{R} ainsi défini présente l'avantage de reporter sur une même courbe les résultats d'expérience réalisés à diverses périodes en éliminant les variations du matériel végétal utilisé.

Résultats

Température supra-optimale et multiplication de la souche VMT (C)

La figure 1 montre les variations du rapport \underline{R} en fonction de la durée du transfert à 36° .

L'incorporation du ^{32}P dans le RNA viral est accélérée pendant les 8 heures qui suivent le transfert à 36° . Cette incorporation diminue brutalement entre le 8ème et la 9ème heure et représente environ la moitié de celle dans le lot des disques témoins.

L'incorporation de ^{14}C proline dans la protéine capsidaire semble relativement indépendante de la température au cours des 16 premières heures qui suivent le transfert à 36° , le rapport \underline{R} étant voisin de 1 pendant tout ce laps de temps. C'est seulement vers la 17ème heure que l'on peut mettre en évidence une forte diminution de cette incorporation. En vue d'interpréter ces résultats, nous avons étudié l'incorporation de ces éléments dans les constituants de plantes saines.

Notons au passage qu'il n'a pas été possible de mettre en évidence une relation entre la température et la pénétration des éléments radio-actifs dans les disques de feuilles, ce qui montre bien l'action de cette dernière sur le métabolisme de la plante et sur la multiplication du virus.

Influence d'un changement de température sur l'incorporation de ^{32}P et ^{14}C proline dans les RNA et les protéines solubles de plantes saines.

Des disques de feuilles de tabac sains sont maintenus dans les mêmes conditions expérimentales que celles utilisées pour le matériel virosé; les RNA totaux et les protéines solubles sont extraits comme cela a été décrit dans "méthodes". Les activités du ^{32}P et de la proline ^{14}C sont évaluées.

Le transfert des disques sains de 24 à 36° s'accompagne d'une forte accélération de l'incorporation du ^{32}P dans les RNA cellulaires. Après 10 heures de transfert, cette accélération s'atténue, mais l'incorporation de ^{32}P reste toujours plus élevée à 36° qu'à 24°.

Par contre, l'incorporation de ^{14}C proline ne semble pas différente à 24 ou 36° (fig. 2A).

Dans une autre expérience, les disques sont d'abord maintenus 48 h à 36°, puis transférés à 20°. On observe le phénomène inverse pour l'incorporation de ^{32}P , avec une incorporation plus faible du ^{32}P à 20° qu'à 36°. Mais on note toujours une grande stabilité dans l'incorporation de la ^{14}C proline dans les protéines solubles (fig. 2B).

Les courbes obtenues avec des disques virosés, sont tout à fait superposables à ces dernières quant à l'incorporation des marqueurs radio-actifs dans les RNA totaux et les protéines solubles.

Incorporation de ^{35}S dans des disques virosés par le VMT (C) à 36° et 24°

Pour nous rendre compte de l'influence de la nature de l'élément marqué (fig. 3), nous avons remplacé la proline ^{14}C par un produit moins élaboré, le ^{35}S . Les résultats obtenus sont analogues à part une légère augmentation de l'incorporation de cet élément entre 3 h et 9 h de transfert à 36°.

Etude de l'action d'un transfert de 36 à 20° sur l'incorporation de ^{32}P et ^{14}C proline dans les constituants du VMT (C) et du VMT (TC).

Des lots "disques inoculés" soit avec VMT (C), soit avec VMT (TC) sont transférés après 48 h de survie à 36° de 1 à 30 h à 20°. En ce qui concerne le développement de la souche VMT (C), l'incorporation de ^{32}P dans le RNA viral reste analogue (fig. 4A), que les disques inoculés soient maintenus à 36° ou transférés 1 à 9 h à 20°. Après ce laps de temps, \bar{R} augmente, indiquant que la replication du RNA augmente. L'incorporation de la ^{14}C proline dans les protéines virales, montre que \bar{R} devient supérieur à 1 après 15 h de transfert à 20° reflétant avec un certain décalage le nouveau rythme de synthèse du RNA viral.

L'incorporation de ^{32}P dans la RNA viral de la souche thermophile VMT (TC) est immédiatement ralentie quand les disques sont transférés de 36 à 20° (fig. 4B) observation déjà faite pour le matériel sain maintenu dans les mêmes conditions expérimentales (fig. 3B). Mais après 17 h de transfert à 20°, l'incorporation de la proline ^{14}C dans les protéines capsidaires est affectée par le transfert avec \bar{R} tendant vers 0,5. Ce retard semble donc important et significatif par rapport à l'incorporation du ^{32}P dans le RNA viral.

DISCUSSION - CONCLUSION

L'étude de l'action des températures non-optimales sur la multiplication du VMT avait permis d'envisager que celle-ci s'exerçait sur la replication du RNA viral et non sur la synthèse de la protéine capsidaire ou sur l'assemblage RNA protéine (LEBOURIER et HIRTH). Cependant, les difficultés

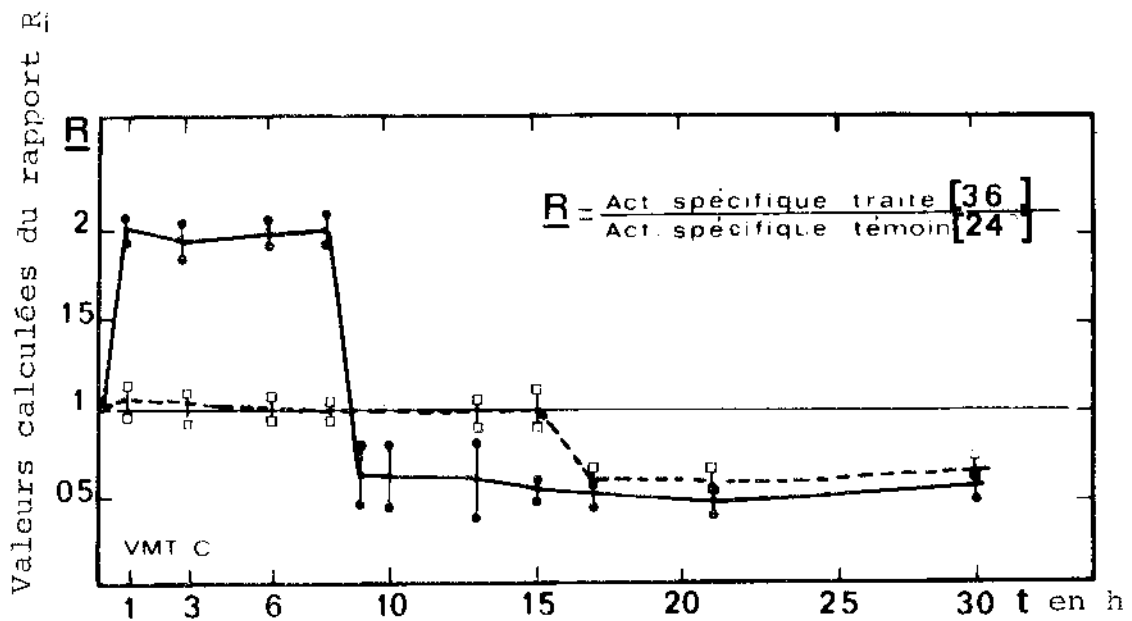


Figure 1 : Cinétique du rapport R de l'incorporation de ^{32}P dans le RNA viral (\bullet) et ^{14}C proline (\square) dans la protéine capsidaire de VMT (C) à 36 et 44°

La longueur des traits verticaux représente l'écart maximum des valeurs expérimentales.

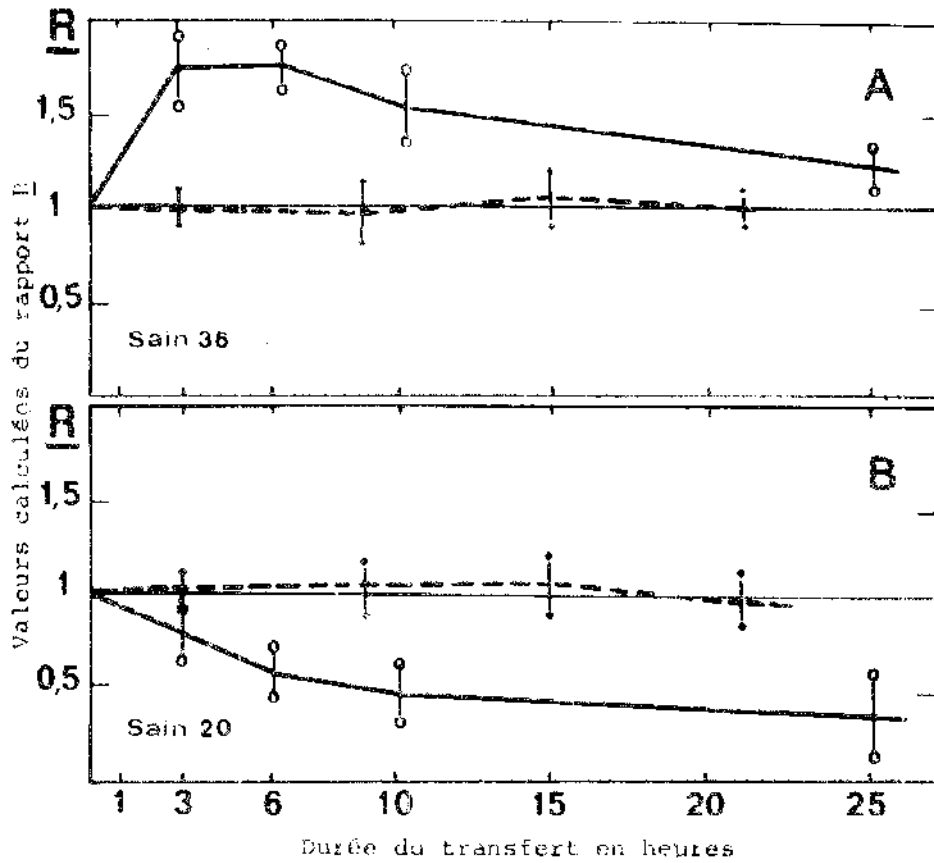


Figure 2 : Evolution du rapport R des activités spécifiques du ^{32}P et de ^{14}C proline reflétant l'incorporation de ces éléments dans les RNA totaux (—) et les protéines solubles (---) extraits de disques de feuilles de Tabacs sains.

A: Survie 48h à 24° puis transfert à 36° pour les échantillons traités

B: Survie 48h à 36° puis transfert à 20° pour les échantillons traités.

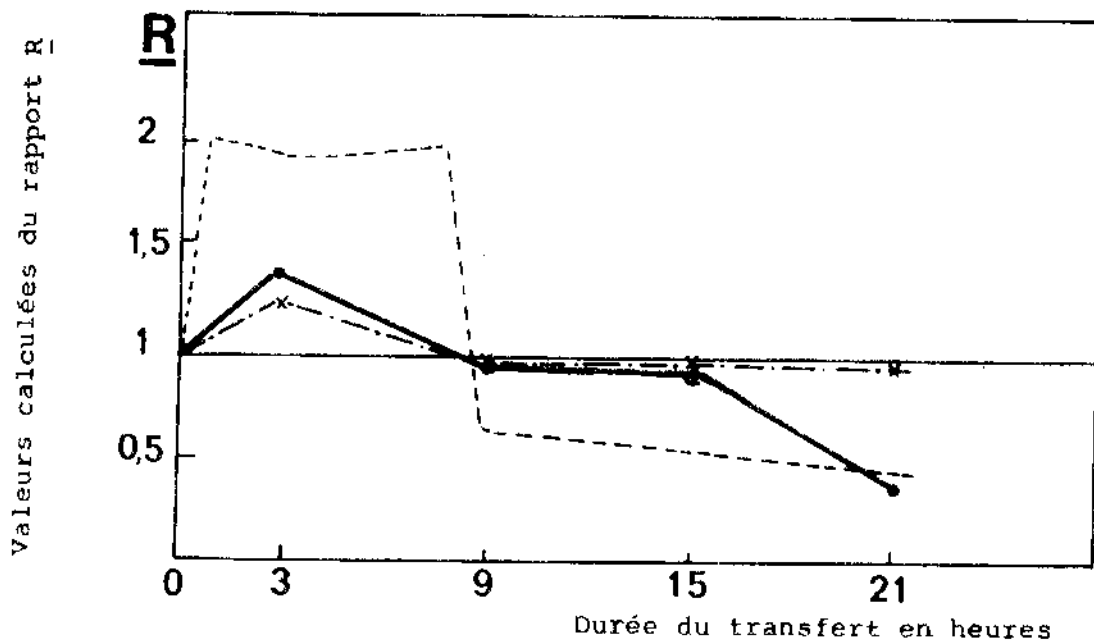


Figure 3 : Evolution du rapport \underline{R} de l'incorporation de ^{32}P (-----) dans le RNA viral ,et de ^{35}S (●—●) dans la protéine capsidaire de VMT(c) à 36° et 24° ; de ^{35}S (✕-.-.-.-✕) dans les protéines solubles extraites de disques de Tabac virosé

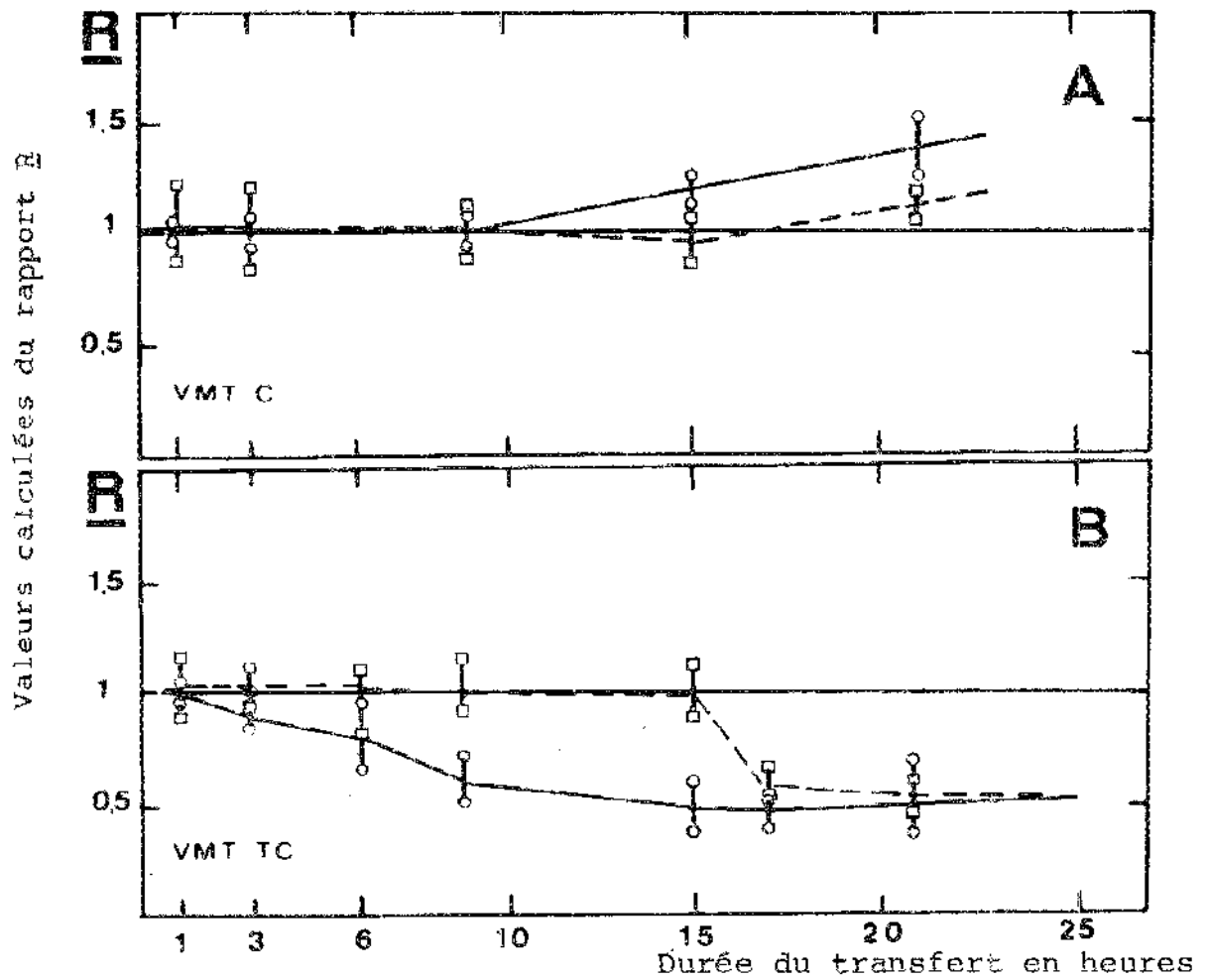


Figure 4 : Cinétique du rapport R de l'incorporation de ^{32}P dans le RNA viral (○) et ^{14}C proline dans (□) la protéine capsidaire provenant de disques maintenus à 36 et 20°.

A : disques inoculés avec la souche VMT (C)

B : disques inoculés avec la souche VMT (TC)

que l'on a éprouvées et que l'on éprouve encore actuellement à mettre en évidence le RNA viral libre laissait planer une incertitude sur cette conclusion, ce qui avait permis à d'autres chercheurs travaillant avec un autre virus et retrouvant les mêmes résultats de proposer d'autres explications (KASSANIS et Mac CARTHY). Les résultats rapportés ici tendent à montrer que dans les conditions expérimentales utilisées, les températures non-optimales exercent une importante action sur la synthèse du RNA viral.

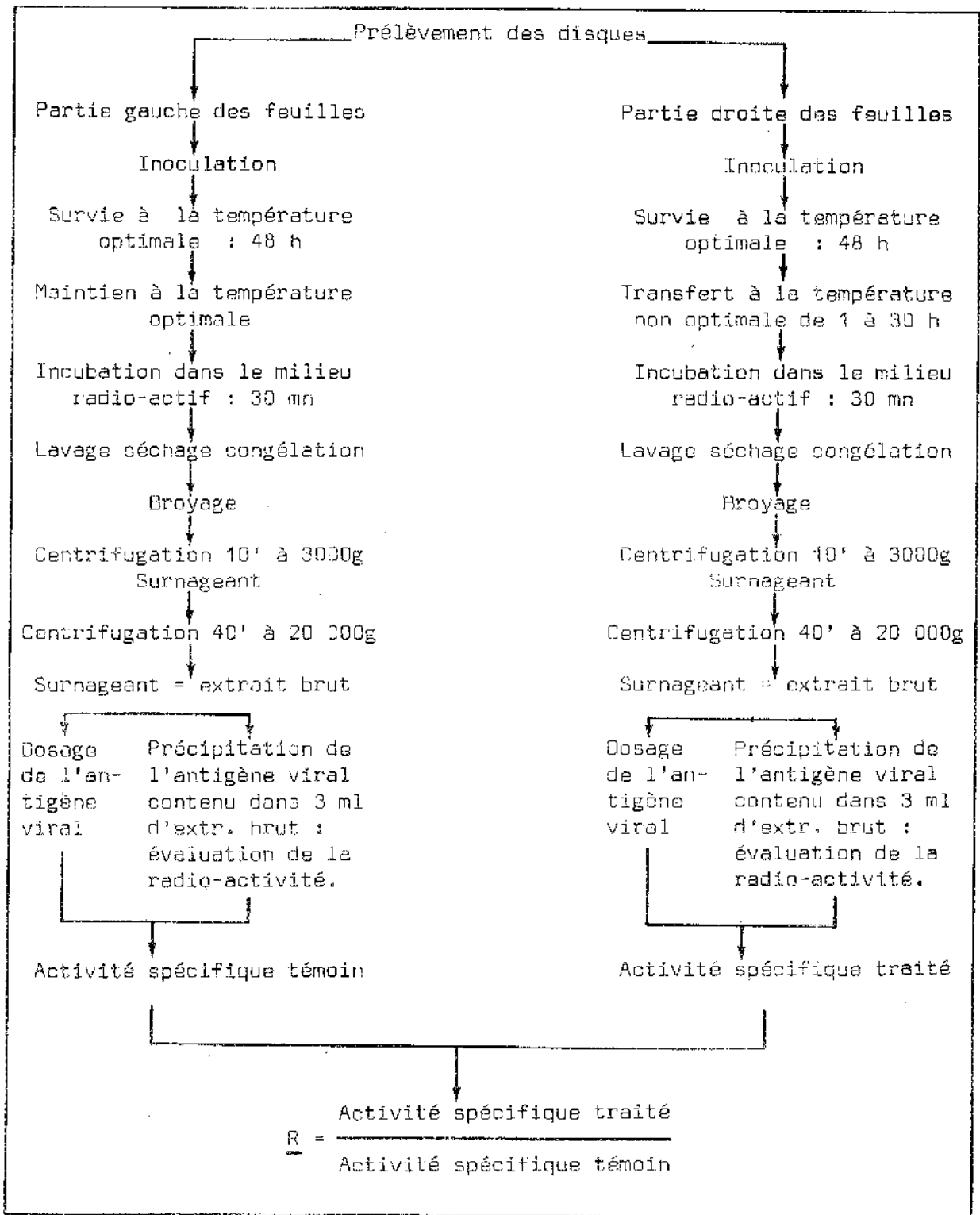
L'augmentation de l'incorporation du ^{32}P (fig. 1) dans le RNA du virus de la souche commune se développant à 36° ne traduit pas forcément une augmentation de sa biosynthèse. On retrouve ce même phénomène aussi bien pour le RNA total de disques sains (fig. 2A) que pour le RNA viral de la souche thermophile (fig. 4B). Cette action des températures non optimales sur la replication du RNA viral n'est pas immédiate, mais se manifeste toujours après une dizaine d'heures de transfert. Ce temps critique suggère soit que les changements de température n'interviennent pas sur les systèmes de replication en cours de fonctionnement, soit que cette action s'exerce par l'intermédiaire d'une ou plusieurs substances devant être préalablement synthétisées par la plante.

Le comportement des protéines capsidaires contribue à démontrer l'action spécifique de la température sur le RNA viral, ceci étant d'ailleurs confirmé par les résultats obtenus par l'étude de la souche VMT (TC). Il faut également remarquer la faible action des variations de température sur l'incorporation de la ^{14}C proline tant dans les protéines cellulaires (fig. 2) que dans la protéine capsidaire, la proline étant un acide aminé stable, elle serait directement transférée sur les RNA messagers, ce qui expliquerait ce phénomène. Aussi, lors de l'expérience où nous avons remplacé la ^{14}C proline par un produit moins élaboré, marquant les acides aminés soufrés, le ^{35}S , les résultats obtenus (fig. 3) sont tout à fait analogues, bien qu'une légère augmentation de l'incorporation de cet élément soit mis en évidence dans les protéines totales ou virales dès les premières heures du transfert à 36° .

Il semble donc qu'un équilibre soit maintenu durant les premières heures du transfert entre la synthèse du RNA viral et celle des unités de structure protéique destinées à l'encapsidation, il faut attendre une vingtaine d'heures après le transfert pour observer une chute brutale de la synthèse des protéines, reflet de la disparition des RNA messagers fonctionnels. L'accumulation de protéine observée n'est donc pas due à une perturbation de la morphogénèse virale : ce qui implique que des molécules de RNA préalablement synthétisées continuent à jouer le rôle de modèle pendant un certain temps.

On est donc conduit à imaginer, pour interpréter les résultats décrits, que certaines molécules de RNA viral jouent le rôle de messenger stable, tandis que les autres seraient encapsidées au fur et à mesure de leur synthèse, ce qui peut confirmer l'existence d'un système de régulation permettant, dans les conditions optimales de multiplication, l'encapsidation de la totalité du RNA par les protéines capsidaires disponibles.

En conclusion, et pour expliquer l'action de la température sur la multiplication du VMT, nous pouvons penser avec LWOFF que celle-ci agit sur le fonctionnement du ou des enzymes qui interviennent dans la replication du RNA viral. Une autre explication proposée par KASSANIS est que la température agit indirectement sur la synthèse du RNA viral en modifiant la sensibilité des systèmes de replication aux substances synthétisées par la cellule infectée. Nous avons donc pu montrer également, grâce à l'emploi des radio-éléments, que le RNA viral jouant le rôle de messenger avait une durée de vie relativement longue.



SCHEMA EXPERIMENTAL UTILISE POUR CHAQUE EXPERIENCE

BIBLIOGRAPHIE

- LEBEURIER G. et BADRE M.L. : *Effet de diverses températures sur la cinétique du développement du VMT.* C.R. Acad. Sci. (1963) 257, 2559-2564.
- LEBEURIER G. et HIRTH L. : *Isolement et propriétés d'une souche mutante du VMT se multipliant aux températures supra-optimales.* C.R. Acad. Sci. (1965) 260, 2353-2356.
- LEBEURIER G. et WURTZ M. : *Propriétés d'un clone isolé à partir d'une souche thermophile du VMT.* C.R. Acad. Sci. (1968) 267, 871-874.
- VICKERY H.B. PUCKER G.W.,
WAKEMANN A.J. et
LEAVENWORTH C.S. : *The metabolism of amides in green plants I. The amides of tobacco leaf.* J. Biol. Chem. (1937) 119, 369-382.
- LOWRY O.L. ROSENBRUGH N.J.
et FARR A.L. : *Protein measurement with the Folin phenol reagent.* J. Biol. Chem. (1951) 193, 265-275.
- GIERER A. et SCHRAMM G. : *Die Infectiosität der Nuclein säure aus TMV*
Zeits für Natur. (1956) 116, 138-142.
- PINCK L. HIRTH L. et
BERNARDI G. : *Isolation of replicative RNA from alfalfa mosaic virus infected plants by chromatography on hydroxyapatite columns.* B.B Res; Com. (1968) 31, 481-487.
- LWOFF A. : *The thermosensitive event of the viral cycle.*
Cold Spring Harbor Symp. quant. Biol. (1962) 27, 159-174.
- KASSANIS B. et MAC CARTHY
D. : *The quality of virus as affected by the ambient temperature.* J. Gen Virol. (1967) 1, 425-440.
- CENTRE ORSTOM TANANARIVE
B.P. 434
LABORATOIRE DES VIRUS DES PLANTES - STRASBOURG