

RECHERCHES
SUR LES INHIBITEURS DES MOUVEMENTS STOMATIQUES.
ACTION DE L'Α-HYDROXY-METHANESULFONATE DE SODIUM
SUR LES STOMATES DE VERONICA BECCABUNGA L.

par I. MOURAVIEFF.

Le mécanisme biochimique grâce auquel s'accomplit le mouvement d'ouverture des stomates à la lumière n'a pas encore trouvé d'explication satisfaisante. C'est pourquoi toute tentative nouvelle de lui apporter une solution, éveille l'attention et stimule les recherches. L'hypothèse récente de ZELITCH et WALKER (1) sur le rôle primordial de l'acide glycolique a déjà suscité de nombreux commentaires et critiques (2, 3, 4) et ne semble pas avoir enthousiasmé les chercheurs. Cependant par la valeur des arguments avancés et la cohérence du système proposé, elle offre un attrait incontestable; il serait difficile de l'écarter sans l'avoir sérieusement considérée au préalable.

MÉCANISME DES MOUVEMENTS STOMATIQUES D'APRÈS ZELITCH ET WALKER :

Les premières recherches de ZELITCH et OCHOA du Laboratoire de biochimie de l'Université du Connecticut ont permis d'isoler et de purifier à partir de feuilles vertes deux enzymes importantes, dont la glycolique acide oxydase. L'étude de son action tant sur broyats de feuilles que sur modèles a conduit ZELITCH à l'idée, qu'elle peut servir de transporteur d'électrons à partir de DPNH vers l'oxygène. Par la suite, ZELITCH voulant montrer la réalité de l'existence de ce système dans les feuilles vertes a utilisé des inhibiteurs de cette oxydase, analogues par leur structure à l'acide glycolique. Son choix s'est arrêté sur les α-hydroxysulfonates, inhibiteurs compétitifs de la glycolique oxydase (5).

En supprimant l'oxydation de l'acide glycolique et son évolution ultérieure, l'acide s'accumule dans les tissus et ZELITCH a pu effectivement le montrer par de nombreuses analyses. Mais il a constaté aussi que dans ces conditions les stomates restent toujours fermés, même si les feuilles ou les disques foliaires sont placés dans les meilleures conditions pour les faire ouvrir (6). L'accumulation de l'acide glycolique et le degré de l'ouverture des stomates seraient en rapport avec la concentration de l'inhibiteur dans la solution sur laquelle se trouvent les disques foliaires. L'addition à dose croissante d'acide glycolique sous forme de glycolate de potassium par exemple à la solution de l'inhibiteur, ralentit la fermeture des stomates conformément au principe de l'inhibition compétitive.

Un autre fait important semble confirmer les rapports étroits entre le métabolisme de l'acide glycolique et les mouvements des stomates. On connaît l'extrême sensibilité de l'appareil stomatique à la tension de CO₂. Or, il se trouve que ce gaz est un puissant inhibiteur de la synthèse de l'acide glycolique dans les feuilles (7). Même les tensions de l'ordre de 0,1 % suffisent à empêcher la formation de cet acide et en même temps l'ouverture des stomates. En fournissant de l'acide glycolique aux feuilles maintenues dans une atmosphère à teneur en gaz carbonique supérieure à la normale, ZELITCH et WALKER constatent, que

les stomates ne se ferment pas (1). Le rôle de l'acide glycolique leur semble ainsi nettement démontré.

En ce qui concerne le mécanisme par lequel l'acide glycolique participe aux mouvements des stomates, les auteurs pensent, que l'acide produirait, ou bien des substances osmoactives nécessaires à élever le potentiel osmotique ou serait impliqué dans un « mécanisme de pompe », qui utiliserait l'ATP ou autre composé en équilibre avec cette substance, produite dans les chloroplastes par phosphorylation photosynthétique (8).

RECHERCHES PERSONNELLES :

Nous avons répété les expériences de ZELITCH et WALKER sur plusieurs espèces végétales systématiquement éloignées. Quelques observations concernant l'action de l'acide α -hydroxy-2-pyridineméthanesulfonique sur les stomates de *Veronica beccabunga* et *Leucanthemum lacustris* ont été déjà récemment publiées (4). Nous exposons maintenant nos expériences sur les stomates de *Veronica beccabunga* avec un autre inhibiteur, l' α -hydroxyméthanesulfonate de sodium (HMS).

Méthodes. Les méthodes utilisées sont celles en usage dans notre laboratoire. Les feuilles sont prélevées le soir, la veille du jour de l'expérience et sont gardées la nuit, la base de la feuille dans l'eau, en chambre humide à l'obscurité, à 20° C. Le matin les feuilles sont coupées en long suivant la nervure médiane en deux parties. L'une servira de témoin, l'autre moitié sera soumise aux expériences.

Les solutions sont préparées une heure avant les expériences, avec de l'eau distillée ou les tampons phosphate appropriés. Les pièces foliaires sont maintenues d'abord sur les solutions à l'obscurité à 20° C pendant deux heures, temps nécessaire pour permettre aux produits de pénétrer dans les tissus. Ensuite l'extrémité inférieure de la pièce foliaire est plongée de 2 à 3 mm dans la même solution, la partie supérieure étant maintenue verticalement à l'air libre. Le tout est introduit dans un petit récipient en plexiglass dans lequel on peut faire circuler de l'air contenant ou non du CO₂, à doses variables. Dans les expériences sur l'influence de la lumière, les récipients en plexiglass sont éclairés pendant 3 heures par une ampoule dépolie de 75 W avec écran d'eau, de façon à avoir un éclairage au niveau des feuilles de 3 500 lux.

A la fin des expériences, des coupes paradermales épaisses sont effectuées dans les feuilles et examinées dans des solutions de glucose du même potentiel osmotique que les cellules épidermiques, ou plus concentrées lorsqu'il s'agit de rechercher la plasmolyse limite.

Stomates de Veronica beccabunga L. Les stomates de l'épiderme inférieur de la feuille de *Veronica* sont de taille relativement petite, mais bien fonctionnels pendant toute l'année. Ils sont pourvus de gros plastes nettement colorés en vert. La plante est cultivée en serre froide pendant la mauvaise saison et en plein air à partir du mois d'avril.

Nous avons déjà montré (4) que les stomates de *Veronica* étaient peu sensibles à l'acide α -hydroxy-2-pyridineméthanesulfonique. Par contre, ils se montrent nettement plus sensibles vis-à-vis de l' α -hydroxyméthanesulfonate de sodium (HMS), comme il résulte du tableau ci-dessous.

TABLEAU I. — Largeur de l'ostiole en microns et potentiel osmotique à la plasmolyse limite (O_{pl}) en mol glucose des stomates de *Veronica beccabunga* L. en présence et en absence de α -hydroxy-méthanésulfonate de sodium (HMS).

concentration HMS en gr/L	avec HMS				sans HMS			
	Obscurité		lumière		Obscurité		lumière	
	μ	O_{pl}	μ	O_{pl}	μ	O_{pl}	μ	O_{pl}
en présence de gaz carbonique								
1	0	0,75	5	1,1	0	0,75	6	1,2
2	0	0,8	4	1,0	0	0,75	6	1,2
3	0	0,8	1	0,8	0	0,8	7	1,25
4	0	0,5	0	0,6	0	0,75	7	1,25
en absence de gaz carbonique								
1	2	0,8	6	1,2	5	1,0	7	1,25
2	0	0,7	5	1,1	5	1,1	7	1,25
3	0	0,5	2,5	1,0	4	1,1	6	1,2
4	0	0,4	2	0,8	5	1,15	7	1,2

Effets de l'adjonction du glycolate de sodium au HMS.

ZELITCH et WALKER expérimentant sur les feuilles de Tabac rapportent que si on ajoute de l'acide glycolique à la solution de l' α -hydroxy-méthanésulfonate de sodium, l'influence de l'inhibiteur est atténuée, le glycolate empêchant la fermeture des stomates en vertu du principe de

TABLEAU 2. — Largeur de l'ostiole en microns et potentiel osmotique à la plasmolyse limite (O_{pl}) des stomates de *Veronica beccabunga* en présence de HMS seule ou avec le glycolate de sodium.

concentration HMS en gr/L	avec HMS				avec HMS et glycolate de sodium			
	Obscurité		lumière		concentration HMS + glycolate en gr/L	Obscurité		lumière
	μ	O_{pl}	μ	O_{pl}		μ	O_{pl}	
en présence de gaz carbonique								
2	0	0,8	4	1,1	2 + 2	0	0,8	3,5 1,0
3	0	0,75	1	0,9	3 + 1	0	0,72	1 0,9
en absence de gaz carbonique								
3	0	0,45	5	1,2	3 + 1	0	0,45	4 1,2
4	0	0,32	4	1,2	4 + 1	0	0,33	4 1,2

l'inhibition compétitive. Les deux auteurs considèrent ce fait comme étant d'une grande importance pour leur hypothèse.

De notre côté nous avons examiné avec soin l'action sur l'ouverture de solutions de HMS, additionnées de glycolate de sodium à la lumière ou à l'obscurité. Les résultats sont consignés dans le Tableau 2.

Il est évident que le glycolate ne s'est pas opposé à la fermeture des stomates de notre *Veronica* provoquée par HMS, comme il le ferait selon ZELITCH et WALKER avec les feuilles de Tabac.

Influence de gaz carbonique sur les stomates en présence du glycolate de sodium.

Un autre argument de valeur qui devrait venir confirmer les idées de ZELITCH est celui du rôle de gaz carbonique. Lorsque la tension de ce gaz dépasse la normale les stomates ne s'ouvrent pas faute de pouvoir utiliser l'acide glycolique, qui ne se synthétise plus en présence de ce gaz. En faisant absorber aux feuilles de Tabac du glycolate de sodium, ZELITCH a réussi à les maintenir ouverts à 50 % dans une atmosphère à teneur en gaz carbonique de 1,8 %.

Nous avons légèrement modifié la procédure de ZELITCH. Au lieu d'essayer de maintenir les stomates ouverts, il nous a semblé plus logique de les faire ouvrir par le glycolate en présence de gaz carbonique à une tension supérieure à la normale.

Les feuilles sont maintenues préalablement deux heures sur des solutions de glycolate de sodium à 2 gr/L. Elles sont ensuite redressées verticalement, la base de la feuille (2-3 mm) restant dans la solution, le reste du limbe étant au-dessus de celle-ci. Les cupules avec les feuilles sont introduites dans un récipient en plexiglass, dans lequel on fait passer de l'air enrichi à 1 % en CO₂. Les feuilles sont éclairées pendant 3 heures par un faisceau lumineux identique à celui des autres expériences. Les résultats sont reproduits dans le Tableau 3.

TABLEAU 3. — Largeur de l'ostiole en microns et potentiel osmotique à la plasmolyse limite (O_{pl}) des stomates éclairés de *Veronica beccabunga* dans une atmosphère enrichie en gaz carbonique en présence du glycolate de sodium.

sans glycolate de sodium		avec glycolate de sodium			
μ	O _{pl}	concentration gr/L	μ	O _{pl}	
en présence de gaz carbonique à teneur normale					
5	1,1	2	5	1,1	
5	1,3	3	6	1,15	
en présence de gaz carbonique à 1 %					
0	0,35	2	0	0,4	
0	0,38	3	0	0,42	

Il est évident, que le glycolate de sodium n'a pas favorisé l'ouverture des stomates de *Veronica*, même bien éclairés, dans des conditions de teneur en gaz carbonique supérieure à la normale.

Discussion. Nos expériences avec les feuilles de *Veronica beccabunga* montrent nettement que l'hypothèse de ZELITCH et WALKER sur le rôle de l'acide glycolique dans les mouvements de stomates ne se trouve pas vérifiée dans le cas de cette espèce. Ainsi : 1) l'adjonction de l'acide glycolique aux solutions de α -hydroxyméthanesulfonate de sodium ne fait pas ouvrir les stomates à la lumière (Tableau 2), comme cela devrait se produire suivant l'hypothèse ; 2) en fournissant aux feuilles de l'acide glycolique ou du glycolate de sodium en présence de gaz carbonique à la tension supérieure à la normale, les stomates ne s'ouvrent pas à la lumière (Tableau 3). Pourtant l'acide glycolique leur a été fourni avant et pendant l'expérience. D'ailleurs l'accumulation de l'acide glycolique dans les tissus foliaires constatée par ZELITCH et WALKER, après action des α -hydroxysulfonates ne constitue pas une preuve de la participation de cet acide aux mouvements stomatiques. Il est bien plus vraisemblable de considérer les α -hydroxysulfonates comme des inhibiteurs de la photosynthèse, comme le suggèrent MEINDER et MANSFIELD (2). Celle-ci étant supprimée ou fortement déprimée, les stomates se conduisent comme à l'obscurité, c'est-à-dire ne s'ouvrent pas, gênés par le CO_2 respiratoire. Cette interprétation de l'action des α -hydroxysulfonates sur la photosynthèse se trouve confirmée par le fait, que dans l'atmosphère dépourvue de gaz carbonique, c'est-à-dire dans les conditions réalisées par la photosynthèse, et en présence de doses assez élevées de HMS, les stomates s'ouvrent un peu (Tableau 1).

Si parmi les facteurs multiples, qui interviennent dans les mouvements des stomates, nous considérons le gaz carbonique, il y a de grandes chances à ce que son action s'exerce par la voie des carboxylations cellulaires, dont le rôle très important n'est plus à souligner (9). Ces carboxylations sont étroitement liées au métabolisme des acides et on sait que, depuis longtemps déjà on a constaté des fluctuations de l'acidité des cellules stomatiques liées aux mouvements.

Un point cependant doit être avancé en faveur de l'emploi des α -hydroxysulfonates. Ces substances ne paraissent pas toxiques pour les cellules, à en juger par les mouvements des éléments figurés du protoplasme et à ce titre peuvent rentrer dans l'arsenal des produits utilisables dans les recherches sur la photosynthèse et aussi comme « anti-transpirants ».

Résumé. L' α -hydroxysulfonate de sodium, inhibiteur de la glycolique oxydase empêche l'ouverture des stomates de *Veronica beccabunga* à la concentration de 3 gr/L. Pourtant l'hypothèse de ZELITCH et WALKER sur le rôle de l'acide glycolique dans les mouvements n'est pas confirmée. En effet, l'addition du glycolate de sodium à l'inhibiteur ne s'oppose pas à l'action de celui-ci, de même que les solutions de glycolate ne font pas ouvrir les stomates dans une atmosphère enrichie en CO_2 . En outre, en absence de gaz carbonique, même dans les solutions assez concentrées, les stomates s'ouvrent un peu à la lumière. Tous ces arguments tendent à prouver, que les α -hydroxysulfonates sont surtout des inhibiteurs de la photosynthèse.

BIBLIOGRAPHIE.

1. ZELITCH I., D.A. WALKER. — The role of Glycolic acid metabolism in opening of leaf stomata. *Plant Physiol.*, 1964, 39, 856-62.
2. MEIDNER H., T.A. MANSFIELD. — Stomatal responses to illumination. *Biol. Rev.*, 1965, 40, 483-509.
3. HEATH O.V.S., T.A. MANSFIELD, H. MEIDNER. — Ligh-induced stomatal opening and the postulated role of glycolic acid. *Nature*, 1965, 207, 960-62.
4. MOURAVIEFF I. — Sur les réactions de l'appareil stomatique à l'acide hydroxy-2-pyridineméthanesulfonique, inhibiteur de la glycolique oxydase. *C.R. Acad. Sci.*, 1965, 261, 4 487-89.
5. ZELITCH I. — Hydroxysulfonates as inhibitors of the enzymatic oxydation of glycolic and lactic acids. *Journ. Biol. Chem.*, 1957, 224, 251-60.
6. ZELITCH I. — Biochemical control of stomatal opening in leavec. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.*, 1961, 47, 1 423-33.
7. WARBURG O., G. KRIPPAHL. — Glycolic acid synthesis in *Chlorella*. *Zeitschr. Naturforsch.*, 1960, 15 b, 197-99.
8. ZELITCH I. — Environmental and biochemical control of stomatal movement in leaves. *Biol. Rev.*, 1965, 40, 463-82.
9. MOYSE A. — La physiologie des feuilles de *Bryophyllum darremontianum* Berger : La synthèse, la dégradation et l'utilisation des acides organiques. In « Travaux dédiés à Lucien Plantefol », Paris 1965, pp. 21-44.

COMPTÉ RENDU
DE L'EXCURSION BOTANIQUE DANS LE QUEYRAS
SOUS LA DIRECTION DE M. RUFFIER-LANCHE

Nous avons rayonné en partant de Saint-Véran.

1^{re} excursion : La Chapelle de Clausis.

A la hauteur de la carrière de marbre vert : *Campanula Allionni* RR, *Nigritella Cornelianana*.

Le long du torrent, en aval de la Chapelle : *Hedysarum obscurum*, *Senecio Doronicum*, *Armeria alpina* = *Statice montana*, *Campanula spicata* R, *Viola calcarata* var. *flava*, *Campanula cenisia* RR, *Pinguicula Arveti*, *Astragalus aristatus*, *Salix reticulata*, *Phaca astragalina*, *Schoenus nigricans*, *Hieracium Aurantiacum*, *Androsace carnea*, *Veronica bellidifolia*, *Anemone baldensis* R.

2^o excursion : Saint-Véran et au-dessus de Saint-Véran vers La Chapelle :

Cynoglossum Dioscoridis, *Astragalus Onobrychis*, *Juncus triglumis*, *Astragalus Danicus* R, *Geranium aconitifolium*, *Echinosperrnum Lappula*, *Bunium Bulboscastenum*, *Crepis montana*.

3^o excursion : Entre Ville-Vieille et Château-Queyras à l'Adret :

Festuca vallesiaca, *Juniperus sabina* R, *Astragalus alopecuroides* RR, *Nonnea pulla* RR (station trouvée par M. RUFFIER-LANCHE), *Oxytropis pilosa*, *Astragalus austriacus* RR, *Prunus brigantiaca* RR, *Erysimum australe*, *Artemisia Absinthium*.

4^o excursion : La Vallée supérieure du Guil :

Polygonum alpinum, vers l'Echalp ; *Primula viscosa* Allioni, *Oxytropis Halleri* RR, *Orchis cruenta*, *Hugueninia tanacetifolium*, *Isatis*