

**Zeitschrift:** Archives des sciences et compte rendu des séances de la Société  
**Band:** 47 (1994)  
**Heft:** 3: Archives des Sciences

**Artikel:** Investigations par résonance magnétique nucléaire (RMN) sur la membrane plasmique de l'épinard pendant l'induction florale  
**Autor:** Crespi, Pierre / Greppin, Hubert  
**DOI:** <https://doi.org/10.5169/seals-740191>

### **Nutzungsbedingungen**

Die ETH-Bibliothek ist die Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Zeitschriften und ist nicht verantwortlich für deren Inhalte. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern beziehungsweise den externen Rechteinhabern. [Siehe Rechtliche Hinweise.](#)

### **Conditions d'utilisation**

L'ETH Library est le fournisseur des revues numérisées. Elle ne détient aucun droit d'auteur sur les revues et n'est pas responsable de leur contenu. En règle générale, les droits sont détenus par les éditeurs ou les détenteurs de droits externes. [Voir Informations légales.](#)

### **Terms of use**

The ETH Library is the provider of the digitised journals. It does not own any copyrights to the journals and is not responsible for their content. The rights usually lie with the publishers or the external rights holders. [See Legal notice.](#)

**Download PDF:** 07.10.2024

**ETH-Bibliothek Zürich, E-Periodica, <https://www.e-periodica.ch>**

Archs Sci. Genève	Vol. 47	Fasc. 3	pp. 273-286	Décembre 1994
-------------------	---------	---------	-------------	---------------

Communication présentée à la séance du 16 juin 1994

INVESTIGATIONS  
 PAR RÉSONANCE MAGNÉTIQUE NUCLÉAIRE (RMN)  
 SUR LA MEMBRANE PLASMIQUE DE L'ÉPINARD  
 PENDANT L'INDUCTION FLORALE

PAR

Pierre CRESPI\* & Hubert GREPPIN\*

ABSTRACT

**NMR investigations on spinach plasma membrane during the flowering induction process.** - The leaves plasma membrane could be implicated in the flowering induction process. Preliminary studies have shown structural modifications of this membrane at the critical photoperiodic time. To precise these observations, analyses by proton and <sup>31</sup>P Nuclear Magnetic Resonance have been undertaken. This technic allow us to arrest the order degree of purified plasmalemma. On the other hand, membrane model systems have been used to precise the gibberellic acid action. This compound has the same effect, *in vivo*, on the plasma membrane structure than photoperiodic change. These investigations have shown modifications of the membrane fine structure. These should be due to the appearance of hexagonal H<sub>II</sub> phases and/or to a modification of the H<sub>2</sub>O molecules links on our membrane systems.

INTRODUCTION

Une des hypothèses pour expliquer le phénomène de l'induction florale impliquerait des modifications structurales, compositionnelles et fonctionnelles du plasmalemma (GREPPIN H. *et al.* 1987; GREPPIN H. *et al.* 1990). Des études précédentes ont montré un épaissement du plasmalemma des cellules de feuilles d'épinard au moment de la photoinduction de la floraison de cette plante (AUDERSET G. *et al.* 1986, MARTINEC J. *et al.* 1993). Des résultats similaires ont aussi pu être obtenu après un traitement par l'acide gibbérellique (CRESPI P. *et al.* 1989), un composé connu pour favoriser la floraison de nombreuses plantes. Divers produits (Acide gibbérellique, Ca<sup>2+</sup>, un ou des composés cytosoliques) provoquent le même effet, *in vitro*, sur du plasmalemma purifié (CRESPI P. *et al.* 1993).

Le passage de la plante à un régime lumineux différent pourrait donc induire une modification de la structure globale du plasmalemma. Les membranes biologiques sont sous la forme d'une bicouche lipidique (modèle de Singer et Nicholson 1972). Une

---

\*Laboratoire de Biochimie et Physiologie végétales, 3, pl. de l'Université, CH-1211 Genève 4

certaine quantité de lipide pourrait être cependant présente sous une autre forme et principalement sous la forme hexagonale  $H_{II}$ . De nombreux facteurs peuvent favoriser ou défavoriser l'expression de ces formes aussi bien dans des membranes artificielles (liposomes) que biologiques. L'aspect colloïdal des membranes est rarement abordé avec des membranes natives. Leur complexité de composition est tellement importante qu'elle rend l'analyse structurale et dynamique très délicate au niveau moléculaire.

Des lipides dispersés en milieu aqueux présentent une très forte tendance à l'aggrégation. Les structures ainsi formées dépendent des types de lipides et de certaines conditions expérimentales. Trois types d'aggrégations sont généralement constatées (mono-couche; double-couche ou lamellaire  $L\alpha$ ; hexagonale  $H_{II}$ ). Nous avons donc décidé d'utiliser les techniques de résonance magnétique nucléaire (RMN) dans le but d'examiner les structures de la membrane. L'étude par RMN du proton de vésicules modèles et de membranes natives donne principalement des informations sur les différents groupes hydrocarbonés des phospholipides. Les résonances des groupes méthylènes des chaînes d'acide gras et des méthyls terminaux nous renseignent sur le degré d'ordre à l'intérieur de la membrane. Ces résonances sont le reflet de résonances composites de l'ensemble des phospholipides. Le pic de résonance des groupes cholines,  $N(CH_3)_3$ , correspond à un seul type de phospholipide: la phosphatidylcholine. Il nous donne des informations sur le degré d'ordre des régions membranaires superficielles. Ce type de spectre nous est donc paru intéressant puisqu'il permet d'avoir accès à deux aspects, intérieur et superficiel de la membrane. La RMN, dans le cas étudié, donne une idée de la mobilité relative des groupements portant des protons. L'intensité relative des résonances observées a été interprétée dans ce sens. Une augmentation de celle-ci correspond à une augmentation de la mobilité, donc à une diminution de l'ordre dans la membrane et réciproquement. Le terme d'ordre est utilisé ici dans son sens général. Il tient compte à la fois de la mobilité et de la viscosité. Il est bien évident que d'autres interprétations de ce paramètre sont aussi acceptables. Celles-ci sont généralement plus restrictives quant à l'image que peut nous donner ce dernier. La structure des membranes est très sensible à des variations de température. De telles variations peuvent nous permettre d'améliorer l'image de l'ordre à ce niveau. L'investigation a donc porté sur des comparaisons de la réaction de membranes d'origines différentes, jour court ou jour long, à des variations de température. La RMN du phosphore  $^{31}P$  a elle aussi été utilisée.

Un autre aspect de la structure des bicouches lipidiques correspond à l'état colloïdal dans lequel elles se trouvent. Aux températures physiologiques, ces membranes sont principalement à l'état de cristaux liquides (état sol), cependant certaines régions peuvent se trouver à l'état gel. Ceci dépend de la composition des différents domaines membranaires. Cette distribution peut être affectée par d'autres facteurs tels que des cations. Ces différents états sont très importants puisqu'ils règlent la fluidité transversale (microviscosité) de la membrane. Des transitions entre ces deux états peuvent être provoquées par des modifications de la température et à une température constante par des modifications de pH, de la concentration en sel ou du degré de saturation des lipides (désaturases). Elles peuvent être caractérisées par la détermination de la courbe de

transition de phase (courbe de fusion) à des températures variables. Ainsi (WOOD A. *et al.* 1972; 1974 a et b) ont mis en évidence, dans le passé, un effet direct des gibbérellines sur des systèmes lipidiques modèles. Quelques expériences ont été réalisées dans ce sens, visant à préciser ces données. La mise en évidence d'un tel phénomène a été réalisée par une technique faisant appel à une sonde fluorescente.

## MATÉRIEL ET MÉTHODES

### Matériel végétal

Les expériences ont été faites sur l'épinard, *Spinacia oleracea* (cv. Nobel). Les plantes, cultivées en phytotron, sont âgées de quatre à cinq semaines au moment des expériences. L'éclairage est produit par des tubes à fluorescence (lumière blanche) Sylvania day light 40 W (ref. 244 32-0). L'éclairage lumineux est de 6 000 lux au niveau des feuilles, ce qui correspond à une énergie de 12 000 ergs / cm<sup>2</sup> / s. Les plantes sont maintenues en photopériode non inductrice de 8 heures de lumière et de 16 heures d'obscurité (état végétatif). La température des chambres du phytotron est maintenue à 20° C ± 0,5°C et l'humidité relative à 70 % ± 10 % le jour et 50 % ± 10 % la nuit.

### Préparation du plasmalemme

25 grammes de limbes de feuilles sont broyés à froid (4° C) au mixer (Braun) dans un tampon d'extraction dont la composition est la suivante: Hépès : 50 mM; Saccharose: 400 mM; KCl : 100 mM; MgCl<sub>2</sub> : 1 mM; Vitamine C : 10 mM. Le broyat obtenu est filtré sur toile à bluter ( 100 µm ) et centrifugé à basse vitesse ( 6 000 g, 10 min., 4° C ). Le surnageant est repris et filtré sur Miracloth. Il est ensuite centrifugé à 30 000 g, 30 min. et à 4° C. On obtient ainsi un culot membranaire, contenant tous les types de membrane de la cellule (culot membranaire brut ). Ce culot est ensuite resuspendu dans du tampon phosphate 5 mM, pH 7,8. Le plasmalemme est alors séparé des autres types membranaires par la méthode de partition de phase (KJELLBOM P. *et al.* 1984).

### Résonance magnétique nucléaire

Les spectres de résonance de proton et du phosphore 31 ont été réalisés sur un appareil RMN Brücker 200 MHZ (200 Mhz pour <sup>1</sup>H et 81,6 Mhz pour <sup>31</sup>P). Les spectres sont obtenus après une analyse de Fourier (système informatique Brücker). L'accumulation, sommation du signal de plusieurs excitations, a souvent été nécessaire (environ 300). La préparation des membranes pour de telles analyses a demandé quelques aménagements. La concentration nécessaire à l'obtention de spectres est au minimum de 1 mg / 100 µl (tube RMN 0,5 cm). Seule la partition de phase, rapide, peut permettre de tels rendements. Le plasmalemme, une fois extrait par la technique classique, est concentré (vitesse maximale microfuge Sorvall) et resuspendu dans un tampon Hépès / D<sub>2</sub>O pD = 7,4. La résolution des spectres peut-être améliorée par une

sonication des membranes (water-bath type sonicator 10 secondes à T ambiante). Cette sonication diminue l'anisotropie de la suspension membranaire. Les spectres ont, soit été faits immédiatement après extraction des membranes, soit après conservation de celles-ci à  $-20^{\circ}\text{C}$  en ampoules scellées sous azote.

### **Techniques d'étude par fluorimétrie de l'effet de l'acide gibbéréllique sur des systèmes membranaires modèles (J.P. Meier ; communication personnelle).**

Les systèmes modèles permettent d'aborder le problème de la fluidité membranaire. Les lipides présentent la caractéristique de s'auto-organiser dans des systèmes aqueux sous la forme de feuillet, doubles ou simples. Cette caractéristique est utilisée pour la fabrication des liposomes. Seul, le réglage de la taille et de l'homogénéité de telles suspensions pose problème. Enfin, ces liposomes peuvent, au moment de leur fabrication, s'organiser en vésicules mono ou multicouches. L'obtention de liposomes monocouches et multicouches dépend de la méthode de fabrication utilisée.

Une solution stock de distéaroyl phosphatidylcholine à 5 mM dans EtOH a été préalablement préparée. Les liposomes sont réalisés dans deux tampons différents permettant l'étude à deux pH différents; 10 mM MOPS, KOH; pH = 7,5 et 10 mM succinate, KOH; pH = 4,5. Les liposomes sont préparés par adjonction à la solution aqueuse d'un volume (22  $\mu\text{l}$ ) de la solution stock de lipides auquel a été préalablement ajouté la sonde fluorescente (chlorophylle a) (LEE A.G. 1975 ) (30  $\mu\text{l}$  solution stock DSPC soit 150 nmol. + 3  $\mu\text{l}$  sonde chlorophylle a soit 3 nmol).

On prélève avec une seringue Hamilton exactement 22  $\mu\text{l}$  de ce mélange. Celui-ci est ensuite injecté très lentement dans une cuve de fluorimètre où est agité 3 ml de tampon 1 ou 2. Le passage lent de la solution éthanolique dans une solution aqueuse permet la formation d'une suspension homogène de liposomes unilamellaires (KREMER J.M.H. *et al.* 1977 ).

L'acide gibbéréllique est ajouté au moment de la fabrication des liposomes. (10  $\mu\text{l}$  solution stock à 200 mM dans EtOH). Des témoins ont été réalisés en tenant compte de la dilution due à l'ajout d'acide gibbéréllique. La sonde de chlorophylle a est préparée à partir d'une extraction acétonique des chlorophylles totales d'épinard du commerce. La chlorophylle a est ensuite séparée par chromatographie sur couche mince. Une solution stock de chlorophylle a dans EtOH est ainsi obtenue et diluée de manière à avoir une concentration de 1 nmol / ml.

Soit un Volume, V, de telle manière que :  $V \text{ (ml)} = 178,6 / (0,543 A_{663\text{nm}} - 0,517 A_{645\text{nm}})$ .

Ce volume est évaporé sous azote et le résidu est repris dans 100  $\mu\text{l}$  EtOH. Toutes ces opérations sont effectuées à l'abri de la lumière. Les courbes de fusion sont obtenues au fluorimètre par mesure de la fluorescence de la chlorophylle a à différentes températures ( $22^{\circ}\text{C}$  à  $65^{\circ}\text{C}$  pour DSPC). Le contrôle de la mesure de la température est effectué directement dans la cuvette (sonde thermométrique) qui a été placée dans un

bain thermostaté. Les paramètres du fluorimètre et de l'enregistrement sont : excitation: 440 nm $\pm$ 10 nm; émission: 660 nm $\pm$ 10 nm; photomultiplicateur: 1160 V; sensibilité: 250 mV; constante de temps: 1 seconde; enregistrement: 200 mV ; 0,2 mm / sec.

## RÉSULTATS

L'obtention de spectres RMN du plasmalemme demande de fortes concentrations en équivalent protéine (1 mg / 100  $\mu$ l). Quelques manipulations ont été nécessaires pour améliorer la résolution des spectres. Le passage aux ultrasons diminue l'hétérogénéité des préparations et permet ainsi une meilleure résolution. Cette "homogénéisation" par les ultrasons de la taille des vésicules peut être standardisée par une mesure, effectuée en parallèle, de l'opacimétrie des suspensions membranaires. Ceci nous a permis de comparer diverses suspensions de plasmalemme dans des conditions optimales de reproductibilité (même concentration en protéine; Homogénéisation par mesure de l'opacimétrie, suivie de la D.O 400 nm, et réglage par la durée du temps d'ultrason).

Ces spectres sont très semblables à ceux obtenus avec, par exemple, de la lécithine. Les différents pics de résonance ont ainsi pu être identifiés (Fig. 1). La seule différence observée entre le témoin lécithine et les spectres obtenus à partir des membranes concerne le pic à 3,5 ppm. Il pourrait provenir d'eau liée aux systèmes membranaires. En effet, les liposomes de lécithine sont directement fabriqués, par exemple par passage du film lipidique aux ultrasons, dans D<sub>2</sub>O. Leur degré d'hydratation est donc quasi nul. Celui des vésicules membranaires est très supérieur et ceci malgré des lavages répétés avec D<sub>2</sub>O. On aurait ainsi à 3,5 ppm un pic composite, formé par la résonance des groupes (CH<sub>2</sub>) N et des molécules d'eau liées aux membranes. Le pic de l'eau libre se situe à 4,7 ppm.

L'étude de l'intensité des résonances des différents pics en fonction de la température a fait ressortir quelques constantes (Figs 2 et 3). Cette intensité, à des températures physiologiques (entre 20°C et 40°C), reste sensiblement constante pour les pics de résonance concernant la membrane, qu'il s'agisse des chaînes carbonées des acides gras ou des CH<sub>3</sub> terminaux. Ces intensités sont toujours sensiblement inférieures pour les membranes issues de plantes induites comparées au témoin (Fig. 3).

Ces différences sont-elles significatives? Malgré les précautions prises pour standardiser nos suspensions membranaires, des paramètres tels que la viscosité ou l'état d'intégrité des membranes pourraient amener de légères différences. Les contenus en acides gras et en phospholipides ne semblent pas varier durant l'induction (PENEL C. *et al.* 1988). Ce paramètre n'influencerait donc pas l'intensité de résonance. Nous ne pouvons donc conclure qu'à une tendance malgré les répétitions d'expériences qui amènent toujours à la même constatation. Les membranes plasmiques provenant de plantes de jour long seraient plus ordonnées.

Le comportement du pic de résonance à 3,5 p.p.m est plus surprenant. En effet, son intensité diminue quand la température augmente, intensité qui de nouveau est moins

ex: phosphatidylcholine

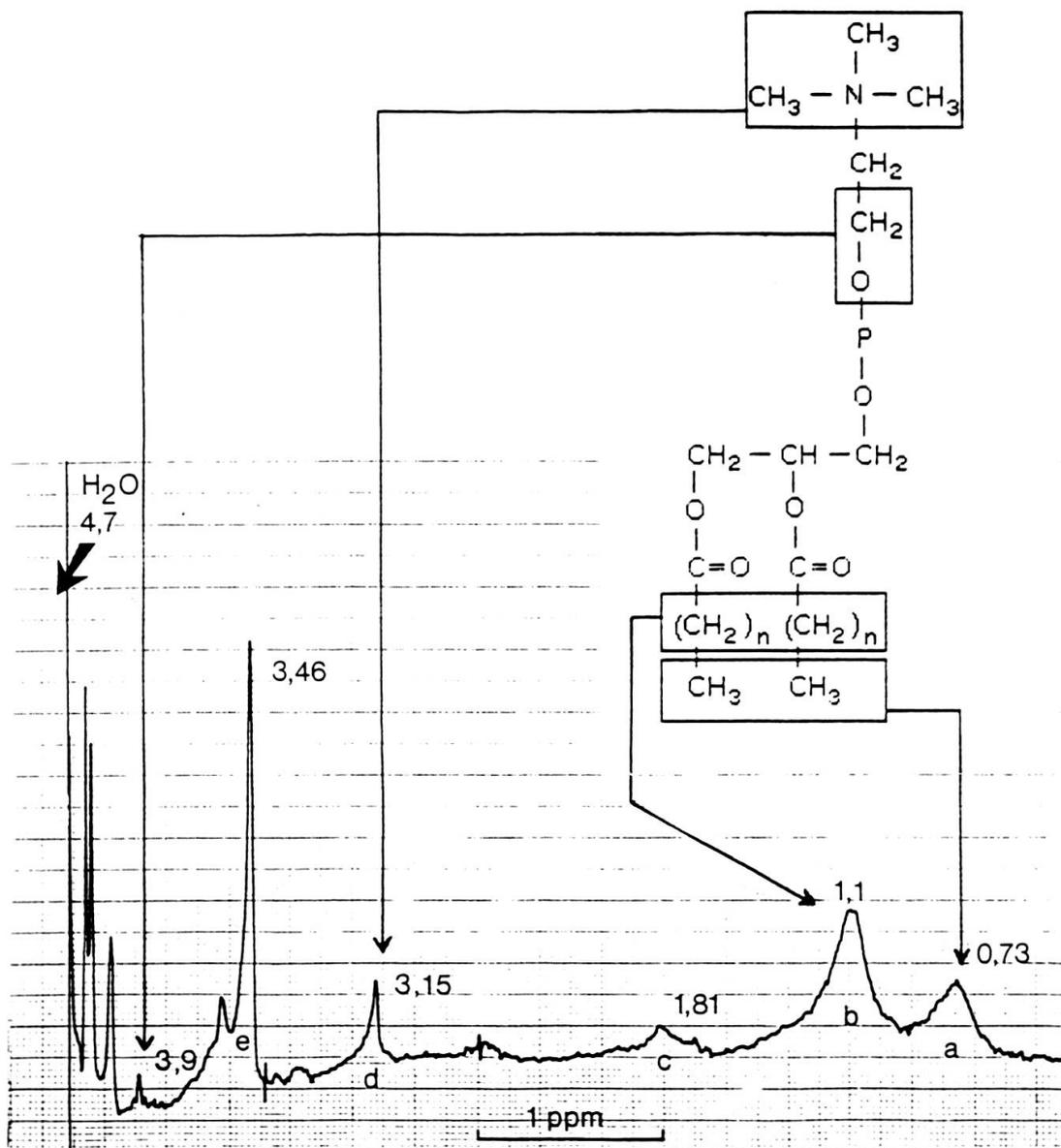


FIG. 1.

Spectre <sup>1</sup>H RMN d'une suspension de vésicules de plasmalemme (1mg/100 µl tampon D<sub>2</sub>O) à 20°C. L'attribution des différentes raies de résonance obtenues a été effectuée par comparaison avec le d'une suspension dans D<sub>2</sub>O de liposomes de lécithine. Les valeurs sont données par rapport au tétraméthylsilane qui est utilisé comme référence. Le spectre est obtenu par une analyse de Fourier (accumulation: 300).

importante pour le plasmalemme provenant de plantes induites. La cinétique de cette décroissance entre 20°C et 40°C est plus rapide chez les plantes témoins. S'il s'agit réellement de molécules d'eau liées à la membrane, cette décroissance peut s'expliquer par un relargage de cette eau dans le milieu, relargage dépendant de l'agitation

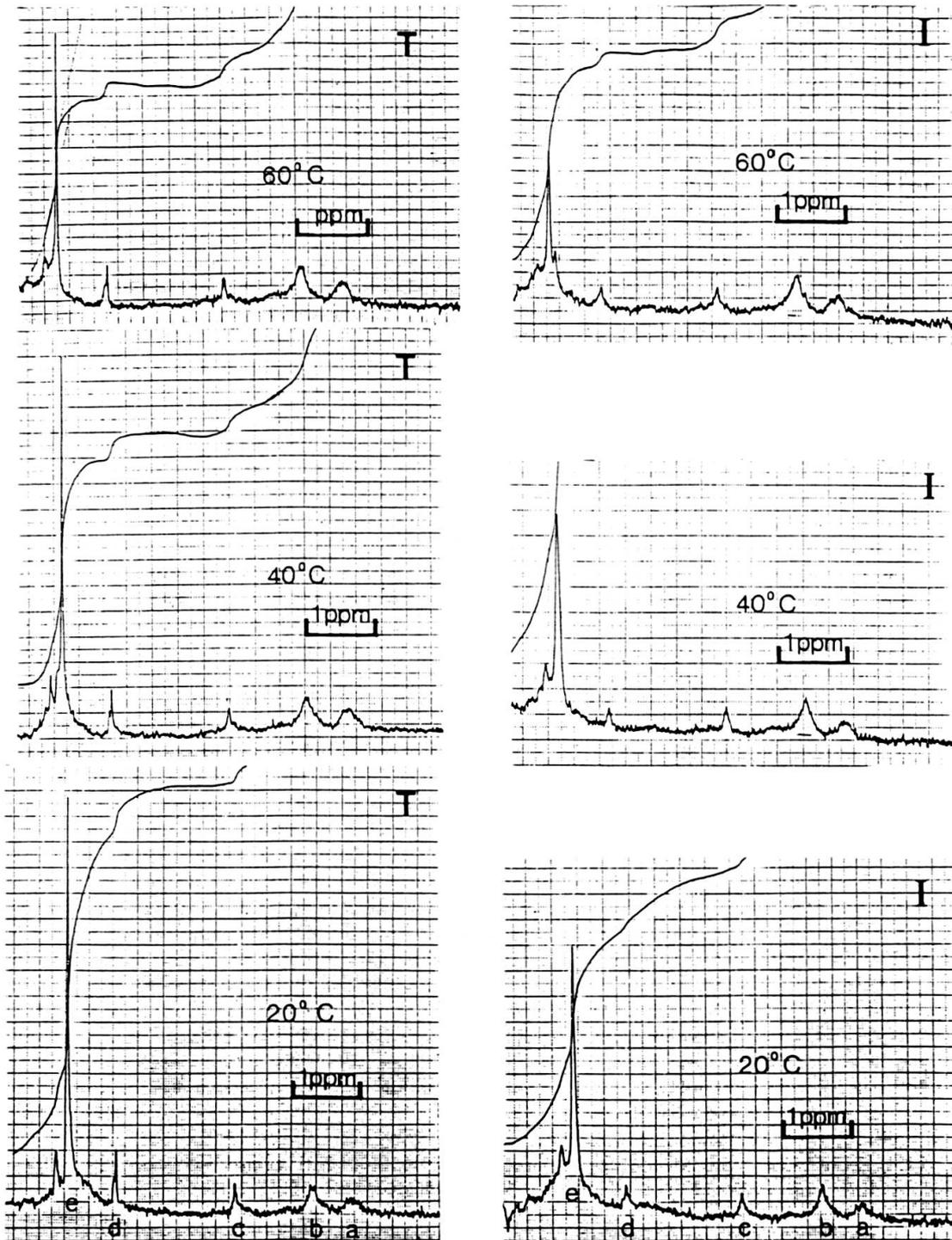


FIG. 2.

Spectre  $^1\text{H}$  RMN de suspensions de vésicules de plasmalemme (1mg/100  $\mu\text{l}$  tampon  $\text{D}_2\text{O}$ ) de plantes de jour court (T: état végétatif) et de plantes induites (I) par 24 heures de lumière continue. Effet de la température sur l'intensité de résonance. Les spectres ont été effectués à trois températures 20°C, 40°C et 60°C. Les paramètres RMN restent inchangés. L'attribution des raies (a,b,c,d et e) correspond à la description de la fig. 1.

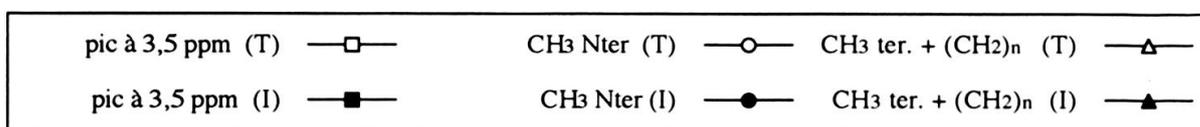
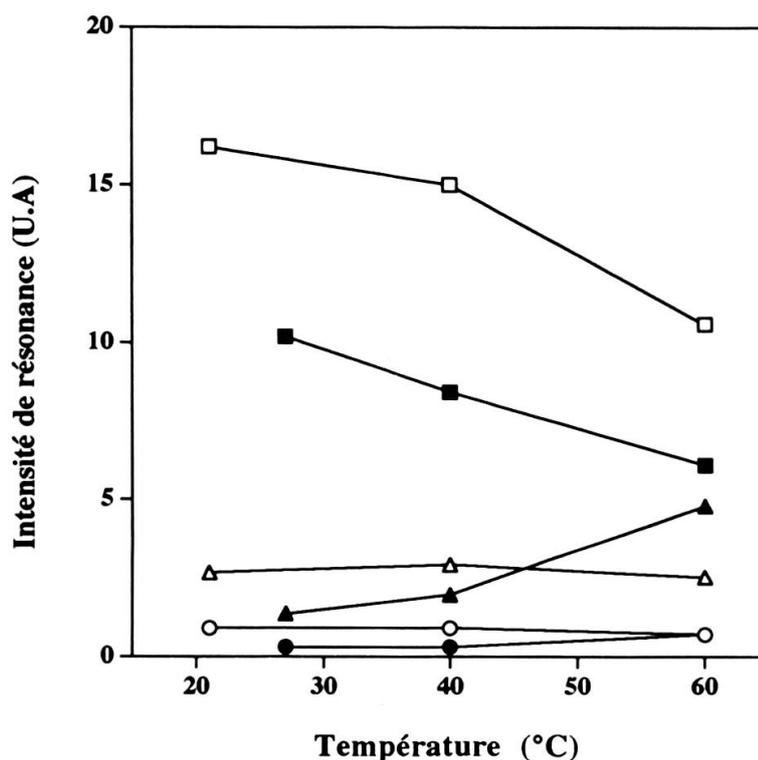


FIG. 3.

Evolution en fonction de la température de l'intensité des pics de résonance de plasmalemme de plantes induites (I: 24 heures de lumière continue) et de plantes témoins (T: jour court de 8 heures de lumière; état végétatif). L'intensité de résonance correspond à la mesure de l'intégrale de chaque pic. Le pic à 3,5 p.p.m correspondrait à de l'eau liée aux systèmes membranaires. Ces expériences ont été répétées 3 fois avec une grande hétérogénéité de l'intensité de résonance suivant les lots de plantes. Les diagrammes obtenus, induit / témoin, à partir de ces trois répétitions sont cependant superposables.

thermique. Le fait que le témoin possède à la fois plus de capacité de fixation et de relargage (60°C) nous amène à la même conclusion d'une augmentation du degré d'ordre du plasmalemme lors de l'induction photopériodique.

De la même manière que précédemment, il a été réalisé sur le plasmalemme de plantes induites par 24 heures de lumière continue et sur des témoins (jour court) des spectres de résonance du phosphore 31 (Fig. 4). Le spectre ainsi obtenu ne présente qu'un seul pic de résonance. Il s'agit d'un pic composite correspondant à l'ensemble des phospholipides membranaires. L'analyse des spectres obtenus sur du plasmalemme de

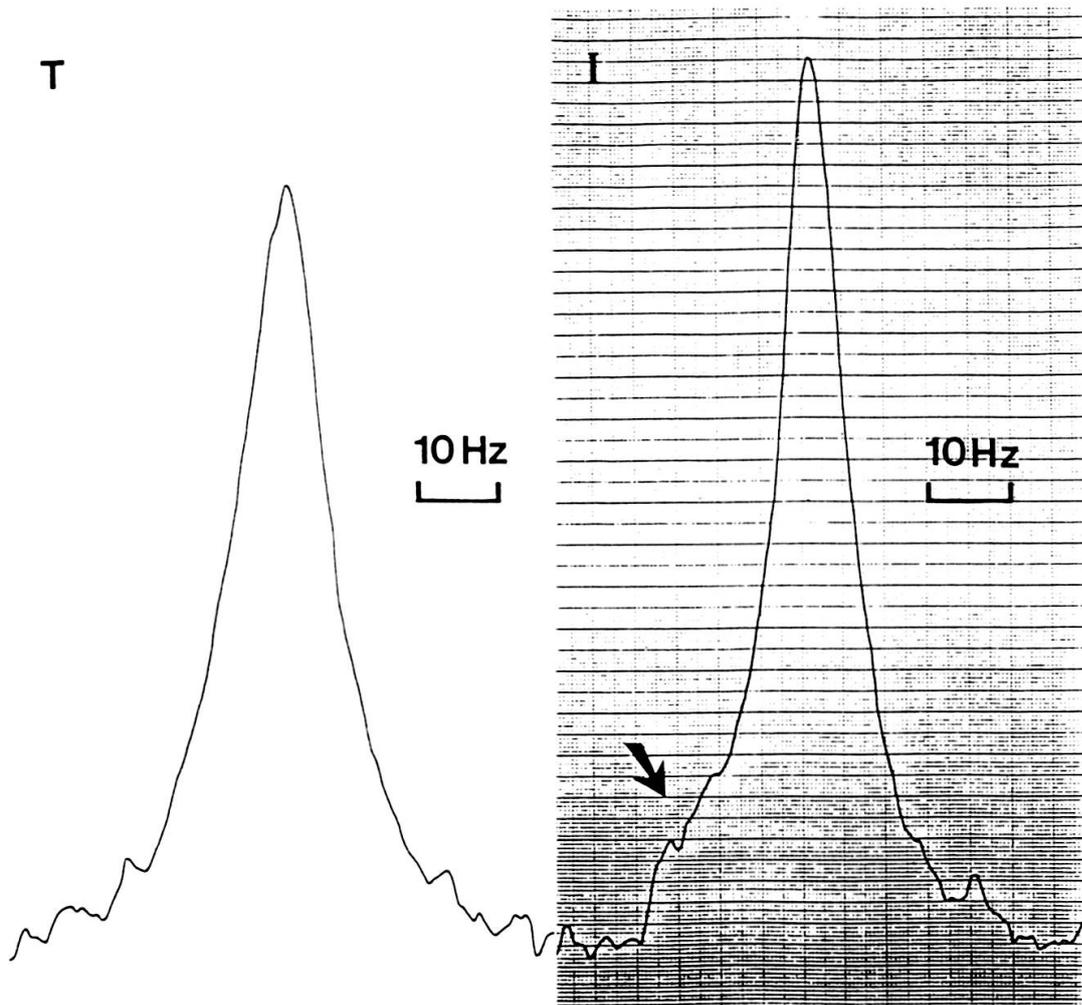


FIG. 4.

Spectre  $^{31}\text{P}$  RMN du plasmalemme de feuille d'épinard. I: après induction par 24 heures de lumière continue. T: témoin; plantes maintenues en jours court; état végétatif. Concentration: 2,5 mg protéines/200  $\mu\text{l}$  tampon  $\text{D}_2\text{O}$ . La flèche indique l'asymétrie observée dans le cas de vésicules de plasmalemme issues de plantes de jour long.

plantes de jour long et de jour court montre l'apparition d'une légère asymétrie du pic après transfert des plantes en lumière continue. Cette asymétrie pourrait être due soit à l'augmentation soit à l'apparition de phospholipides se trouvant dans une phase  $\text{H}_{\text{II}}$ .

Les courbes de fusion de différents phospholipides de composition en acide gras définie ont été réalisées (LEE A.G. 1977). L'effet des gibbérellines sur le comportement thermotropique de ces lipides a aussi été testé à différents pH. Les résultats sont montrés dans les figures 5 et 6. Les études portant sur  $\text{AG}_3$  ont été réalisées sur des liposomes de distéaroyl-phosphatidylcholine ou de dipalmitoyl-phosphatidylcholine. Les courbes de transition peuvent être divisées en trois zones:

- Une phase stable, à basse température, où prédomine l'état gel.
- Une phase de prétransition (probablement due à une modification du degré d'hydratation des liposomes: eau liée).
- Une phase de transition, où l'on passe brusquement d'un mélange gel; cristal-liquide à un état cristal-liquide.

La courbe témoin (Fig. 5) présente une température de transition à environ 52°C et une phase de prétransition allant de 35°C à 48°C. AG<sub>3</sub> affecte, à pH=4,5, à la fois les valeurs des températures de transition et de prétransition. Cette dernière est décalée vers de plus hautes températures (42,5°C à 50°C) avec une forte diminution de son amplitude. La température de transition est aussi décalée vers une plus forte valeur: 53,5°C. L'effet de AG<sub>3</sub> à pH=8 est très peu marqué. Les températures de prétransition sont identiques à celles du témoin, ainsi que la température de transition. AG<sub>3</sub> semblerait donc n'avoir d'effet qu'à des pH acides. L'analyse de ces courbes indique qu'AG<sub>3</sub> participe surtout à la stabilisation de l'état gel à ces pH.

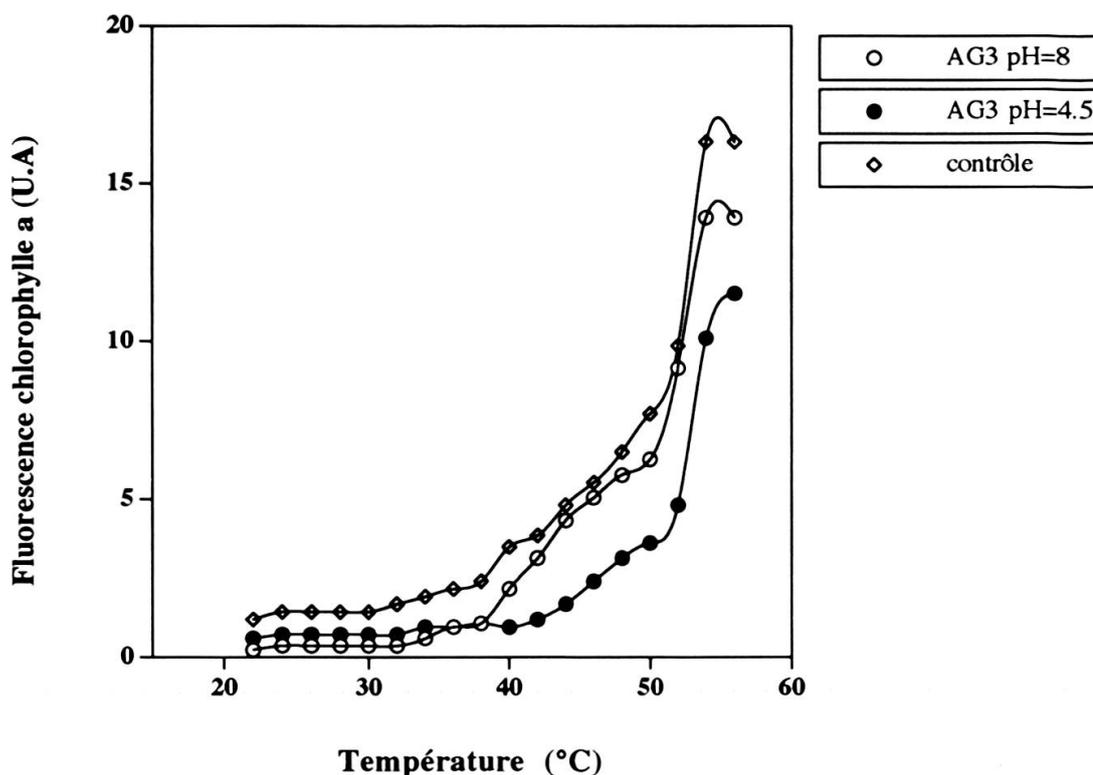


FIG. 5.

Courbe de transition de phase de liposomes de distéaroyl-phosphatidylcholine. Effet de AG<sub>3</sub> (10  $\mu$ l d'une solution stock à 200 mM dans EtOH à 0,5 %). La gibbérelline est incorporée au moment de la fabrication des liposomes. Le contrôle a été effectué à pH=4,5.

Une autre étude a été entreprise avec de la gibbérelline A<sub>1</sub> méthyl ester (Fig. 6). Cette gibbérelline n'a pas d'effet biologique connu. Les expériences ont été faites sur des liposomes de dipalmitoyl-phosphatidylcholine. L'analyse des courbes de transition montre que ni la phase de prétransition, ni celle de transition ne sont affectées par AG<sub>1</sub> méthyl ester et ceci quelque soit le pH. Les différences d'amplitudes observées de la fluorescence sont uniquement dues à un problème technique lié à la méthode de fabrication des liposomes et d'incorporation de la sonde.

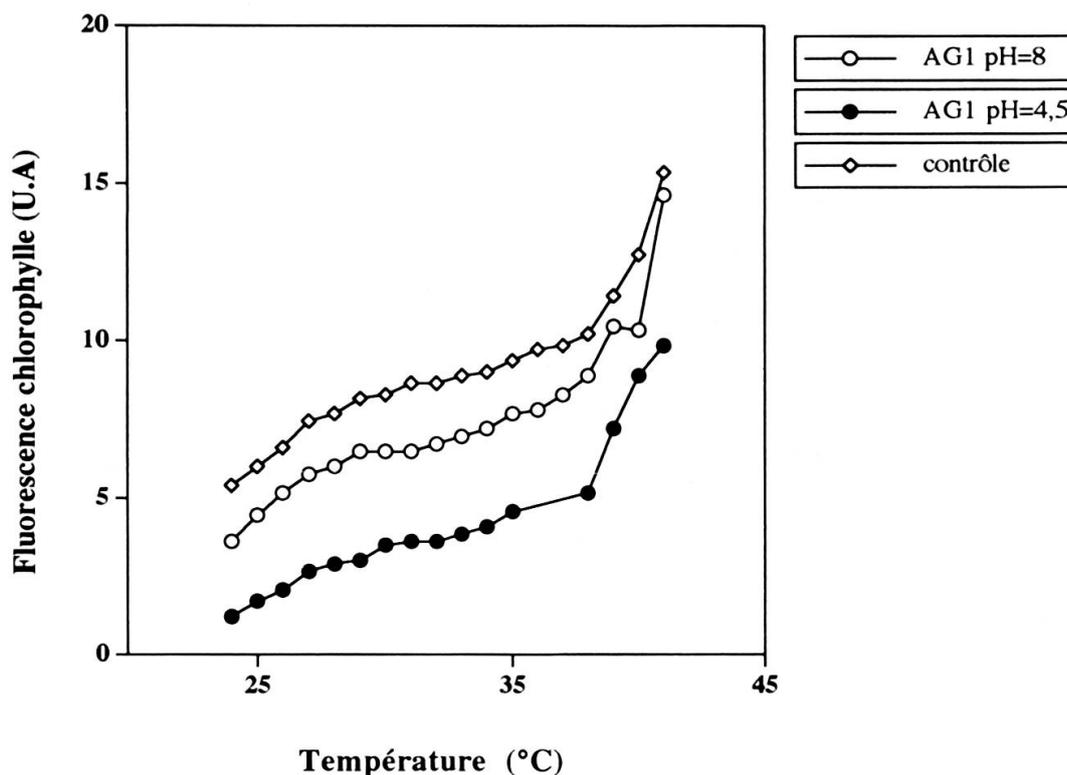


FIG. 6.

Courbe de transition de phase de liposomes de dipalmitoyl-phosphatidylcholine. Effet de AG<sub>1</sub> méthyl ester (10 µl d'une solution stock à 200 mM dans EtOH 0,5 %). Les modalités de l'expérience sont les mêmes que pour AG<sub>3</sub>. Le contrôle a été effectué à pH=4,5.

## DISCUSSION

La résonance magnétique nucléaire du proton nous informe principalement sur les interactions spin-spin et spin-réseau de cet atome (LENK R. 1986). Ces interactions sont sensibles à l'environnement immédiat des atomes et à divers paramètres physiques dont la température. Elles peuvent donc être interprétées par une notion d'ordre (HITZEMANN R.J. *et al.* 1986; LENK R. *et al.* 1981). Cependant, cette conception doit être fortement pondérée par plusieurs remarques. Ces interactions dépendent aussi de la géométrie dans laquelle se trouvent les molécules d'acides gras, courbure des vésicules, dimen-

sions, doubles liaisons cis ou trans et de la force ionique superficielle. Tous ces paramètres sont difficilement maîtrisables dans des suspensions de membranes natives. Ces problèmes sont encore exacerbés par le fait qu'il faille passer les membranes aux ultrasons pour obtenir une bonne résolution des spectres.

Ces expériences font cependant apparaître quelques points. Seule la partie superficielle de la membrane semble être modifiée, plus "ordonnée" après passage de la plante en lumière continue. L'intensité du pic à 3,5 ppm, plus faible dans le cas des membranes issues de plantes de jour long et dont le comportement est différent de celui issu de plantes de jour court lors des expériences à température variable, corrobore ce fait. Ce pic correspondrait d'ailleurs à de l'eau liée aux membranes. En effet, des lavages répétés avec D<sub>2</sub>O diminuent notablement son intensité, sans toutefois la faire disparaître. De même que pour les expériences avec AG<sub>3</sub> sur des systèmes membranaires modèles, l'eau liée aux systèmes membranaires semble donc jouer un rôle important dans leur structure (SEEWALDT V. *et al.* 1981). D'autre part, il semble, d'après les données de la RMN du <sup>31</sup>P, que les phospholipides se trouvant dans une phase hexagonale H<sub>II</sub> augmentent avec l'induction. Ces résultats semblent donc indiquer une modification de la structure fine du plasmalemme au moment de l'induction. Ce type d'expériences suscite quelques remarques. La RMN est une technique séduisante pour de nombreuses raisons; technique non destructrice, accès à des constantes de temps de 10<sup>-8</sup> à 10<sup>-6</sup> x sec.<sup>-1</sup> et relative facilité de mise en oeuvre. Cependant, si des études sur des systèmes modèles ont permis de préciser de nombreux points, leur mise en oeuvre sur des membranes natives pose de nombreux problèmes d'interprétation aggravés par le faible nombre de spectres effectués sur celles-ci à ce jour (DAVIES D.G. *et al.* 1971).

La deuxième partie de nos travaux confirme les données de K.P Pauls *et al.* (1982). Ces derniers ont montré, grâce à des approches techniques différentes, un effet direct des gibbérellines sur des modèles membranaires. Nos résultats montrent qu'AG<sub>3</sub> modifie les courbes de transition de phase de liposomes en solution aqueuse. Le pH semble jouer un rôle important. L'AG<sub>1</sub> méthyl ester n'a pas d'effet. L'effet de AG<sub>3</sub> sur ces modèles amène deux remarques. AG<sub>3</sub> modifie surtout la phase de prétransition. Cette phase pourrait correspondre à l'eau liée à la superficie des membranes. AG<sub>3</sub> interférerait dans ce cas avec la matrice d'eau liée aux groupements polaires des têtes de phospholipides. L'effet des gibbérellines sur la matrice lipidique proprement dite est moins évident. En conclusion, les gibbérellines semblent surtout affecter des régions superficielles des liposomes et par contrecoup uniquement, l'intérieur du double feuillet lipidique.

AG<sub>3</sub> semble donc bien pouvoir jouer un rôle purement physique sur ces modèles membranaires; cependant quel pourrait être l'effet physiologique d'une telle action ? Il est maintenant bien démontré qu'à la fois l'activité des enzymes membranaires et les transports intervenant à ce niveau sont sensibles à l'état physique du support lipidique. Les gibbérellines peuvent agir sur ce dernier à des pH bas. Cependant, un tel phénomène semble peu spécifique. Les gibbérellines agiraient uniquement sur certains domaines de composition lipidique bien définie. Un tel effet reste purement spéculatif. Un

autre problème est lié aux concentrations nécessaires pour obtenir une telle réponse. Si les concentrations peuvent être abaissées par l'utilisation d'un pH bas, elles restent cependant très élevées. Enfin, demeure le principal problème lié à ce type d'études (WOOD A. *et al.* 1974 a. et b. ; HESTER P. *et al.* 1984). Il est en effet très délicat d'extrapoler à des membranes cellulaires, de composition et de structure beaucoup plus complexes, des résultats obtenus sur des systèmes simples à un composant. Le réglage de la fluidité membranaire est surtout le fait des stérols. Leur présence à des concentrations supérieures à 30 moles pour cent par rapport aux lipides masque toute transition de phase. De telles concentrations ont été observées dans des membranes biologiques. Il semble donc que les membranes possèdent une stabilité et la capacité de répondre à des agents perturbants. Un effet direct sur l'état physique des membranes semble donc peu probable. Il n'empêche que les résultats obtenus conforte l'idée d'une modification rapide de la membrane lors de l'induction florale.

### REMERCIEMENTS

Les auteurs remercient le Prof. J. Tronchet et le Dr. F. Barbalat-Rey, de l'unité de chimie pharmaceutique de l'Université de Genève, pour leur collaboration à ce travail.

### RÉSUMÉ

Le plasmalemme foliaire pourrait être impliqué dans le mécanisme de l'induction florale. Des études précédentes ont montré que cette membrane subissait des modifications structurales: épaisseur et aspect en microscopie électronique, au moment de la photopériode critique. Des analyses par Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) du proton et du phosphore 31 ont été entreprises dans le but d'approfondir ces résultats. Cette technique nous permet en effet d'appréhender le degré d'ordre du plasmalemme purifié. D'autres expériences, utilisation d'une sonde fluorescente, ont aussi été réalisées sur des systèmes membranaires modèles pour préciser l'action de l'acide gibbérellique AG<sub>3</sub>. Ce dernier provoque, *in vivo*, le même effet sur la structure du plasmalemme que la modification de la photopériode. Ces deux types d'investigations ont permis de mettre en évidence des modifications de la structure fine du plasmalemme. Celles-ci pourraient être dues soit à l'apparition ou à l'augmentation de phase hexagonale H<sub>II</sub>, soit à des modifications des liaisons des molécules d'eau dans les membranes.

### RÉFÉRENCES

- CRESPI P., CREVECOEUR M., PENEL C. & GREPPIN H. (1989). Changes in plasmalemma after gibberellic acid treatment. *Plant Science*, 62, 63-71.
- CRESPI P., CREVECOEUR M., PENEL C. & GREPPIN H. (1993). *In vitro* modification of spinach plasmalemma thickness. *Biologia Plantarum* 35(4): 491-497.

- DAVIS D.G. & INESI G. (1971). Proton nuclear magnetic resonance studies of sarcoplasmic reticulum membranes. *Biochim. Biophys. Acta*, 241, 1-8.
- GREPPIN H., AUDERSET G., BONZON M., DEGLI AGOSTI R. & PENEL C. (1987). Flowering and leaf-shoot interaction. In: *The cell surface in signal transduction*. Vol H12, 157-167. Eds. E. Wagner, B. Millet & H. Greppin. NATO ASI Series. Springer Verlag, Berlin.
- GREPPIN H., BONZON M., CRESPI P., CREVECOEUR M., DEGLI AGOSTI R. & PENEL C. (1990). Physiological macrofunctions and indicators of the flowering process. In: *Intra- and intercellular communications in plants*. Eds. Millet B. & Greppin H. INRA. 107-123.
- HESTER P. & STILLWELL W. (1984). Effect of plant growth substances on membrane permeability of urea and erythritol. *Biochimica et Biophysica Acta*, 770, 105-107.
- HITZEMANN R.J., SCHUELER H.E., GRAHAM-BRITTAIN C. & KREISHMAN G.P. (1986). Ethanol induced changes in neuronal membrane order. An NMR study. *Biochim. Biophys. Acta*, 859, 189-197.
- KJELLBOM P. & LARSSON C. (1984). Preparation and polypeptide composition of chlorophyll-free plasma membrane from leaves of light grown spinach and barley. *Physiol. Plant.*, 62, 501-509.
- KREMER J.M.H., VAN DEN ESKEER M.W.J., PATHMAMANOHRAN C. & WIERSEMA P.H. (1977). Vesicles of variable diameter prepared by a modified injection method. *Biochemistry*, 16, 3932-3935.
- LEE A.G. (1975). Fluorescence studies of chlorophyll a incorporated into lipid mixtures, and the interpretation of phase diagrams. *Biochem. Biophys. Acta*, 896, 181-186.
- LENK R., BONZON M. & GREPPIN H. (1981). Irreversible thermodynamics and biological evolution in spinach leaves as studied by NMR. *Z. Pflanzenphysiol., Bd.* 101, S. 107-118.
- LENK R. (1986). *Fluctuations, diffusion and spin relaxation*. Ed. Elsevier, Amsterdam.
- MARTINEC J., CREVECOEUR M., CRESPI P. & GREPPIN H. (1993). Plasma membrane thickness and flowering induction in *Chenopodium rubrum* and *Spinacia oleracea*. *Archs Sci. Genève*, vol. 46, Fasc. 2. 233-248.
- PAULS K.P., CHAMBERS J.A., DUMBROFF E.B. & THOMPSON J.E. (1982). Perturbation of phospholipid membranes by gibberellins. *New Phytol.*, 91, 1-17.
- PENEL C., AUDERSET G., BERNARDINI N., CASTILLO F.J., GREPPIN H. & MORRE D.J. (1988). Compositional changes associated with plasma membrane thickening during floral induction of spinach. *Physiol. Plant.*, 73, 134-146.
- SEEWALDT V., PRIESTLEY D.A., LEOPOLD A.C. & FEIGENSON G.W. (1981). Membrane organization in soybean seeds during hydration. *Planta*, 152, 19-23.
- SINGER S.J. & NICOLSON G.L. (1972). The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science*, 175, 720-731.
- WOOD A. & PALEG L.G. (1972). The influence of gibberellic acid on the permeability of model membrane systems. *Plant. Physiol.*, 50, 105-108.
- WOOD A. & PALEG L.G. (1974). Alteration of liposomal membrane fluidity by gibberellic acid. *Austr. J. Plant Physiol.*, 1, 31-40.
- WOOD A., PALEG L.G. & SPOTSWOOD T.M. 1974. Hormone-phospholipid interaction: a possible hormonal mechanism of action in the control of membrane permeability. *Austr. J. Plant. Physiol.*, 1, 167-169.