Modifications du profil protéique dans les protoplastes d'apex d'épinards (Spinacia oleracea L. cv. Nobel) lors de l'induction florale

Autor(en): **Lefort, François / Greppin, Hubert**

Objekttyp: **Article**

Zeitschrift: **Archives des sciences et compte rendu des séances de la Société**

Band (Jahr): **45 (1992)**

Heft 1: **Archives des Sciences**

PDF erstellt am: **29.05.2024**

Persistenter Link: https://doi.org/10.5169/seals-740333

Nutzungsbedingungen

Die ETH-Bibliothek ist Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Inhalten der Zeitschriften. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern.
Die auf der Plattform e-periodica veröffentlichten Dokumente stehen für nicht-kommerzielle Zwecke in Lehre und Forschung sowie für die private Nutzung frei zur Verfügung. Einzelne Dateien oder Ausdrucke aus diesem Angebot können zusammen mit diesen Nutzungsbedingungen und den korrekten Herkunftsbezeichnungen weitergegeben werden.
Das Veröffentlichen von Bildern in Print- und Online-Publikationen ist nur mit vorheriger Genehmigung der Rechteinhaber erlaubt. Die systematische Speicherung von Teilen des elektronischen Angebots auf anderen Servern bedarf ebenfalls des schriftlichen Einverständnisses der Rechteinhaber.

Haftungsausschluss

Alle Angaben erfolgen ohne Gewähr für Vollständigkeit oder Richtigkeit. Es wird keine Haftung übernommen für Schäden durch die Verwendung von Informationen aus diesem Online-Angebot oder durch das Fehlen von Informationen. Dies gilt auch für Inhalte Dritter, die über dieses Angebot zugänglich sind.

Ein Dienst der *ETH-Bibliothek*
ETH Zürich, Rämistrasse 101, 8092 Zürich, Schweiz, www.library.ethz.ch

http://www.e-periodica.ch

Archs Sci. Genève	Vol. 45	Fasc. 1	pp. 69-84	Mai 1992

MODIFICATIONS DU PROFIL PROTÉIQUE DANS LES PROTOPLASTES D'APEX D'ÉPINARDS (*SPINACIA OLERACEA* L. cv. NOBEL) LORS DE L'INDUCTION FLORALE

PAR

François LEFORT*[1] & Hubert GREPPIN*

ABSTRACT

Flowering of spinach plants (*Spinacia oleracea* L. cv. Nobel) was induced by a 24 hour long photoperiodic treatment, overpassing by 12 hours the critical photoperiod of spinach. Apices of induced and non induced plants were cut off and digested in an enzymatic solution containing cellulase, driselase and macerozyme. Resulting protoplasts were used in two ways. First, an original method of *in vitro* translation in induced and non induced apices protoplast lysate was developped. Secondly, purified protoplasts were incubated with ^{35}S methionine. In both cases, neosynthesized proteins were extracted and analysed by SDS-PAGE. Gels were treated for fluorography and then exposed to X-Ray films. In apices protoplasts lysate, three proteins of apparent molar masses of 32, 36 and 38 kDa increased in amount, after induction, when another one of 25 kDa decreased compared to non induced apices protoplasts. In intact apices, six proteins of apparent molar masses respectively of 21, 23, 32, 36, 38, et 64 kDa increased in amount, when four other proteins of 22, 26, 37 et 77 kDa decreased quantitatively. Four of these last modifications (26, 32, 36 et 38 kDa) were similar to those found in the protoplast lysate (25, 32, 36 et 38 kDa).

KEY WORDS: protoplast, in vitro translation, flowering induction, spinach.

RÉSUMÉ

La floraison a été induite chez des plantes d'épinards (*Spinacia oleracea* L. cv. Nobel) par un traitement photopériodique de 24 heures de lumière continue, et correspondant à un dépassement de 12 heures de la photopériode critique de l'épinard. Des apex caulinaires, représentant des échantillons de 30 mg en PF, ont été prélevés sur des plantes induites et non induites. Ces apex ont été incubés dans une solution enzymatique contenant de la cellulase, de la driselase et du macérozyme. Une méthode originale de traduction *in vitro* dans le lysat de protoplastes d'apex d'épinards induits et non induits a été mise au point. Elle a permis de mettre en évidence, par marquage à la méthionine S^{35}, les protéines néosynthétisées. Parallèlement, des protoplastes intacts d'apex ont été incubés en présence de méthionine S^{35}. Les protéines néosynthétisées, dans le lysat de protoplastes ou dans les protoplastes intacts, ont été analysées par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes et révélées par fluorographie. Dans le lysat de protoplastes d'apex, trois protéines de masses molaires apparentes respectivement de 32, 36 et 38 kDa augmentaient en quantité dans les protoplastes d'apex induits. Une autre protéine de masse molaire apparente de 25 kDa diminuait quantitativement après induction. Dans les protoplastes intacts, six protéines de masses molaires apparentes respectivement de 21, 23, 32, 36, 38 et 64 kDa augmentaient quantitativement alors que quatre autres protéines de 22, 26, 37 et 77 kDa diminuaient quantitativement.

Quatre de ces dernières modifications (25, 32, 36 et 38 kDa) étaient similaires à celles trouvées dans le lysat de protoplastes d'apex.

MOTS CLÉS: protoplaste, traduction in vitro, induction florale, épinard.

[1] Laboratoire de Biochimie et Physiologie Végétales, 3, Place de l'Université, CH 1211 Genève 4.
*correspondant.

INTRODUCTION

L'induction florale est souvent dépendante, chez de nombreuses espèces végétales, des conditions environnementales et particulièrement de la photopériode (pour une revue, voir VINCE-PRUE, 1975). Bien que beaucoup d'espèces soient capables de fleurir dans presque toutes les conditions compatibles avec la croissance, les plantes sont généralement classées en plantes de JC, plantes neutres et plantes de JL. Chez l'épinard, qui est une plante de JL, l'induction florale survient après une augmentation de la photopériode au delà de 11 à 12 heures, ce temps d'éclairement étant dit photopériode critique. Si l'apparition de modifications de profils polypeptidiques a été recherchée dans les méristèmes de différentes plantes, lors de l'induction forale, par des méthodes immunochimiques (MIHYALEVA *et al.*, 1982, KOVALEVA *et al.*, 1987) ou par électrophorèse bidimensionnelle (2D), tant au niveau des protéines accumulées (REMBUR *et al.*, 1988, 1989, FRANCIS *et al.*, 1988) que parmi les protéines néosynthétisées (PIÉRARD *et al.*, 1977, 1980, LYNDON *et al.*, 1983), peu de travaux ont porté sur la partie précoce de l'induction florale, c'est-à-dire les heures qui suivent immédiatement le début de l'induction (évocation). Les travaux cités ci-dessus n'ont porté que sur la fin de l'évocation florale et le début de l'organogénèse florale. Parallèlement à notre étude des modifications biochimiques se produisant dans la feuille et son épiderme (LEFORT *et al.*, 1991), après réception du stimulus floral, nous avons étudié les conséquences de l'induction photopériodique dans l'apex caulinaire, 12 heures après le dépassement de la photopériode critique, au niveau du profil des protéines néosynthétisées. Nous avons utilisé, pour ce faire, la méthode d'électrophorèse de protéines sur gel de polyacrylamide en couche mince et en conditions dénaturantes. Les protéines néosynthétisées étaient révélées, après marquage radioactif, par fluorographie. Pour obtenir ces protéines néosynthétisées, nous avons mis au point une technique originale de traduction in vitro dans le lysat de protoplastes d'apex induits et non induits. Nous les avons également extraites de protoplastes intacts incubés en présence de méthionine.

Abréviations

ATP: adénosine triphosphate, $CaCl_2$: chlorure de calcium, GTP: guanosine triphosphate, HEPES: 4-(2-hydroxyethyl)-piperazine-1-ethane sulfonate, KC1: chlorure de potassium, KOH: hydroxyde de potassium, PAGE: polyacrylamide gel electrophoresis, PF: poids frais, RNAsin: ribonuclease inhibitor, SDS: sodium dodecyl sulfate, TCA: trichloroacetic acid.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Matériel végétal

Les plantes utilisées dans cette étude sont des épinards de la variété Nobel. L'épinard (*Spinacia oleracea* L. cv. Nobel) est une plante herbacée dioïque, annuelle mais souvent bisannuelle en culture, de la famille des Chénopodiacées (BONNIER & DOUIN, 1990).

Du point de vue photopériodique, l'épinard est une plante de jour long dont la floraison est induite par une photopériode de 11 à 12 heures d'éclairement total (GREPPIN *et al.*, 1986).

La phase végétative chez l'épinard (4 à 6 semaines en jours courts de 8 heures, lumière blanche, 4000 μ mol m^{-2} s^{-1}, tubes Sylvania) est caractérisée par une très faible croissance de la tige et une production régulière de feuilles due au fonctionnement circulaire et alternatif de l'anneau initial méristématique, situé dans la zone subapicale de l'apex caulinaire.

Conditions de culture

Les akènes d'épinard (*Spinacia oleracea* L. cv. Nobel, Mauser, Suisse) sont semés dans du terreau universel (Bachmann, Suisse). Après 1 semaine, les plantules sont repiquées à raison de 4 par pot (dim. 9x9x9 cm), dans du terreau. Elles sont arrosées 3 fois par semaine avec une solution nutritive Sinesol à 0,3% (Iriland, Suisse) jusqu'à l'âge de 4 ou 5 semaines, date de leur utilisation dans nos expériences.

Les plantes sont maintenues à l'état végétatif grâce à une photopériode de jour court dès le semis (8 heures de lumière, 16 heures d'obscurité). La germination et la croissance sont obtenues dans des enceintes climatisées (phytotron) où la température est maintenue constante à 20°C (± 0,5°C) et l'humidité relative à 70% (± 5%) à la lumière et 50% (± 5%) à l'obscurité.

L'éclairement lumineux diffusé par des tubes fluorescents (Sylvania «daylight» F40W/D-RF, 40 W, USA) est de 4000 lux (4000 μ mol m^{-2} s^{-1}) au niveau moyen des feuilles, ce qui correspond à une puissance de 20,6 W m^{-2} (dans une zone de longueur d'onde émise de 400 à 700 nm).

L'induction florale des épinards est obtenue par transfert des plantes de leurs conditions de culture en jour court en lumière continue (24 heures de lumière) sous un éclairage de la même qualité, à une température constante de 20°C (± 0,5°C) et avec une humidité relative de 70% (± 5%).

Les plantes sont utilisées généralement au bout de 4 ou 5 semaines de culture en conditions végétatives.

Produits chimiques et matériel divers

La solution minérale nutritive d'arrosage Sinesol 237 est un produit de la Société Iriland (Suisse). Les produits chimiques d'usage courant en laboratoire sont de qualité *purissimum pro analysis* sinon de qualité *purum* et ont été achetés chez Fluka (Suisse) principalement et chez Merck (Allemagne).

La méthionine S^{35} (550 MBq.ml^{-1}. > 1000 Ci.$mmol^{-1}$), est de chez Amersham (GB). Les films utilisés pour la fluorographie ainsi que les produits de révélation et de fixation des films sont des produits Kodack (USA). Le cocktail de scintillation liquide a été fourni par Beckman (USA). Enfin l'eau utilisée était de qualité distillée (distilleuse Büchi Fontavapor, Suisse) pour l'usage général, de qualité bidistillée sur colonne de quartz pour la préparation de solutions d'incubation de matériel végétal.

Prélèvement des apex d'épinards

Les apex sont prélevés à l'aide d'une loupe binoculaire (Zeiss, Allemagne). La rosette privée des feuilles est tenue par une brucelle, les primordia sont écartés par la pointe de la lame et l'apex rapidement découpé avec une lame de scalpel. L'opération se fait sous une lumière verte et froide obtenue par l'éclairage d'une fibre optique (Fiber Lite 190 Dolar Jenner Industries Co., USA) filtrée par un filtre vert.

Les apex sont conservés sur lit de glace en attendant leur utilisation.

Préparation des protoplastes

La cellulase utilisée ici est la cellulase Onozuka R10, purifiée de *Trichoderma reesei*. Cette préparation contient une activité cellulase et une activité hémicellulase. Une autre cellulase (driselase) a également été utilisée dans notre solution de digestion. Cette solution contenait également du Macérozyme, c'est-à-dire de la pectinase (purifiée du champignon *Rhizopus*) pour digérer les substances pectiques par ses activités pectine lyase et polygalacturonase.

Le but de notre expérience n'étant pas la culture de protoplastes, mais l'obtention rapide de grandes quantités de protoplastes; nous avons choisi de limiter la purification partielle à une centrifugation permettant l'élimination de tout matériel insoluble.

En ce qui concerne l'aseptie, et comme le but n'était pas la culture de protoplastes, nous nous sommes accommodés d'une absence de stérilisation. La stérilisation des apex aurait réduit leur viabilité et rendu difficile leur prélèvement. Seule la solution de digestion a été stérilisée par filtration (unités de filtration stériles à usage unique Millex-GS 0.22 μ m, Millipore, France) afin d'éviter toute prolifération de microorganismes indésirables.

La solution de digestion est celle utilisée par NOVACK *et al.* (1986) et modifiée pour notre utilisation. La composition est la suivante: 2% cellulase Onozuka R10, 1% Macérozyme R10, 1% driselase, 0.5 M Mannitol, 1mM $CaCl_2$, 25 mM citrate de sodium.

La cellulase et la Macérozyme sont de chez Yakult Honsho Co Ltd (Japon) et la driselase provient de Merck (Allemagne).

Les apex sont prélevés et immédiatement placés dans un tube Eppendorf contenant la solution de digestion et placé dans de la glace.

Une fois le prélèvement terminé, les tubes contenant 80 apex environ sont incubés 4 heures à l'obscurité à température ambiante (20°C) avec une légère agitation.

Après incubation, la solution est aspirée doucement avec une pipette Gilson (France) (Embout 1 ml coupé) et filtré sur un filtre en nylon (100 μ m). Le filtrat est centrifugé à 100 g pendant 8 minutes. Le culot de protoplastes est ensuite lavé 3 fois avec 1 ml d'une solution de mannitol 0.5 M, $CaCl_2$ 1 mM, citrate de sodium 5 mM, tout en évitant de déplacer le culot.

Les protoplastes peuvent être conservés provisoirement dans cette dernière solution.

Traduction in vitro *dans le lysat de protoplastes*

Le culot de protoplastes, après centrifugation est resuspendu dans 0.1 ml d'une solution de traduction *in vitro*, élaborée par DEIKMAN & JONES (1985) pour la traduction in vitro dans l'extrait de germes de blé, et modifiée selon notre expérience, selon les données de MARKU & DUDOCK (1974). On a utilisé 20-50 µ Ci de méthionine S^{35} pour chaque culot de protoplastes. La solution de traduction *in vitro* est de composition suivante: HEPES-KOH 0.1 M pH 7.6, 0.12 ml, KC1 1M, 0.1 ml, acétate de magnésium 50 mM, 0.05 ml, GTP 1 mM, 0.1 ml, ATP 0.1 M, 0.05 ml, mélange d'acides aminés sans méthionine, 0.05 ml, créatine phosphate 0.2 M, 0.06 ml, créatine phosphokinase 0.04 mg/ml, 0.05 ml, RNAsin (50 000 u/ml), 0.025 ml, H20 qsp 1 ml.

La lyse des protoplastes, qui permet d'obtenir un milieu de traduction acellulaire s'effectue, après resuspension des protoplastes dans la solution de traduction, par une congélation dans de l'azote liquide suivie d'une décongélation. Ce processus de congélation-décongélation dans un milieu hypotonique produit une lyse complète des protoplastes. Le mélange est alors incubé pendant 1 heure à 28°C et la réaction de traduction est arrêtée par l'addition d'acide trichloroacétique à 4°C, à une concentration finale de 10%.

Les tubes sont alors laissés sur glace pendant 1 heure pour favoriser la précipitation des protéines, centrifugées à 10 000 g_{max} pendant 10 min. Les surnageants radioactifs sont éliminés, et les culots recouverts avec 1 ml d'acétone à -20°C et laissés 30 min. à -20°C. L'acétone est ensuite éliminée et les culots séchés à l'air libre avant d'être resuspendus dans le tampon d'échantillon de SDS-PAGE.

Après resuspension, des aliquotes sont prélevées et la radioactivité présente mesurée dans un spectromètre à scintillation liquide.

L'évolution de la traduction *in vivo* avec les protoplates entiers ou dans le lysat de protoplastes peut être suivie par comptage des coups précipitables au cours de l'incubation.

Des aliquotes (1 à 5 µ l) sont déposées sur des rectangles de papier Whatmann 3MM (1 cm x 2 cm), piqués sur une plaque de polystyrène de telle façon que les papiers ne touchent pas la plaque. L'échantillon imbibe le papier et est laissé à l'air libre pendant 1 heure. Les rectangles de papier sont ensuite incubés dans du TCA 10% sur glace pendant 10 min. à raison de 10 ml par filtre. Le TCA est ensuite éliminé et remplacé par du TCA 10% à 80°C à raison de 10 ml par filtre. Le liquide est ensuite éliminé et les filtres lavés 2 fois dans du TCA à 5% (10 ml/filtre). Ils sont ensuite lavés 1 fois à l'éthanol, puis 1 fois à l'éther puis séchés à l'air libre et comptés dans 5 ml de cocktail de scintillation Ready Value ™ (Beckmann, USA) dans un scintillateur.

Incubation des protoplastes d'apex d'épinards en présence de méthionine S^{35}

Le culot de protoplastes, obtenu par le protocole décrit précédemment, est lavé puis resuspendu dans 0.1 ml de la solution de lavage (mannitol 0.5 M, $CaCl_2$ 1 mM, citrate

de sodium 5 mM) contenant 20-50 µ Ci de méthionine S^{35}. L'incubation est menée pendant 1 heure à 28°C. Les protoplastes sont lysés par une congélation dans l'azote liquide suivie d'une décongélation. Les protéines sont précipitées par addition de TCA à une concentration finale de 10%, à 4°C pendant au moins 1 heure.

Les échantillons sont ensuite centrifugés à 10 000 g_{max} dans une centrifugeuse de table, et les culots lavés à l'acétone (1 ml) à -20°C pendant 30 minutes. Une fois l'acétone éliminée, les culots sont séchés à l'air libre et resuspendus dans le tampon d'échantillon de SDS-PAGE.

Après resuspension, des aliquotes sont prélevées, pour en mesurer la radioactivité dans un spectromètre à scintillation liquide (cocktail de scintillation Ready Value™, Beckmann).

Electrophorèse de protéines en conditions dénaturantes

Les électrophorèses de protéines sur couche mince de polyacrylamide ont été conduites en conditions dénaturantes selon la méthode décrite par LAEMMLI (1970). Les protéines accumulées, c'est-à-dire présentes dans l'échantillon au moment de l'extraction, sont révélées par coloration au bleu de Coumassie.

Les protéines néosynthétisées, marquées à la méthionine s^{35}, sont révélées par fluorographie.

Après électrophorèse le gel est fixé au moins 1 heure dans une solution de fixation (40% (v/v) méthanol, 10% (v/v) acide acétique) puis lavé pendant 15 minutes dans une solution d'acide acétique à 10% (v/v). Suite à ce lavage, le gel est trempé pendant 15 minutes dans une solution de déshydratation (50% (v/v) méthanol, 50% (v/v) acide acétique) puis transféré pendant 40 minutes dans la solution «fluor» (5% (p/v) 2. méthylnaphtalène, 0.5% (p/v) PPO, 5% (v/v) acide acétique, 95% (v/v) méthanol).

Cette solution de fluor est préparée de la façon suivante: Le 2. méthylnaphtalène est dissous dans 50 ml d'acide acétique glacial. Parallèlement, le PPO est dissous dans 950 ml de méthanol.

Une fois les 2 produits dissous, les 2 solutions sont mélangées et agitées et la solution de fluor prête à être utilisée. Cette solution doit toujours être faite juste avant l'emploi.

Après les 40 minutes d'incubation dans la solution de fluor, le gel est transféré dans un bain d'eau pendant 20 minutes. Le gel devient alors blanc. Il est ensuite séché et exposé contre un film Kodak X-OMAT AR de type 5.

RÉSULTATS

Nous avons tout d'abord analysé les protéines solubes totales, par électrophorèse SDS-PAGE et coloration au bleu de Coumassie, dans des apex et des feuilles d'épinards cultivés en JC et induits un, deux, trois et quatre jours par transfert en lumière continue (Fig. 1.).

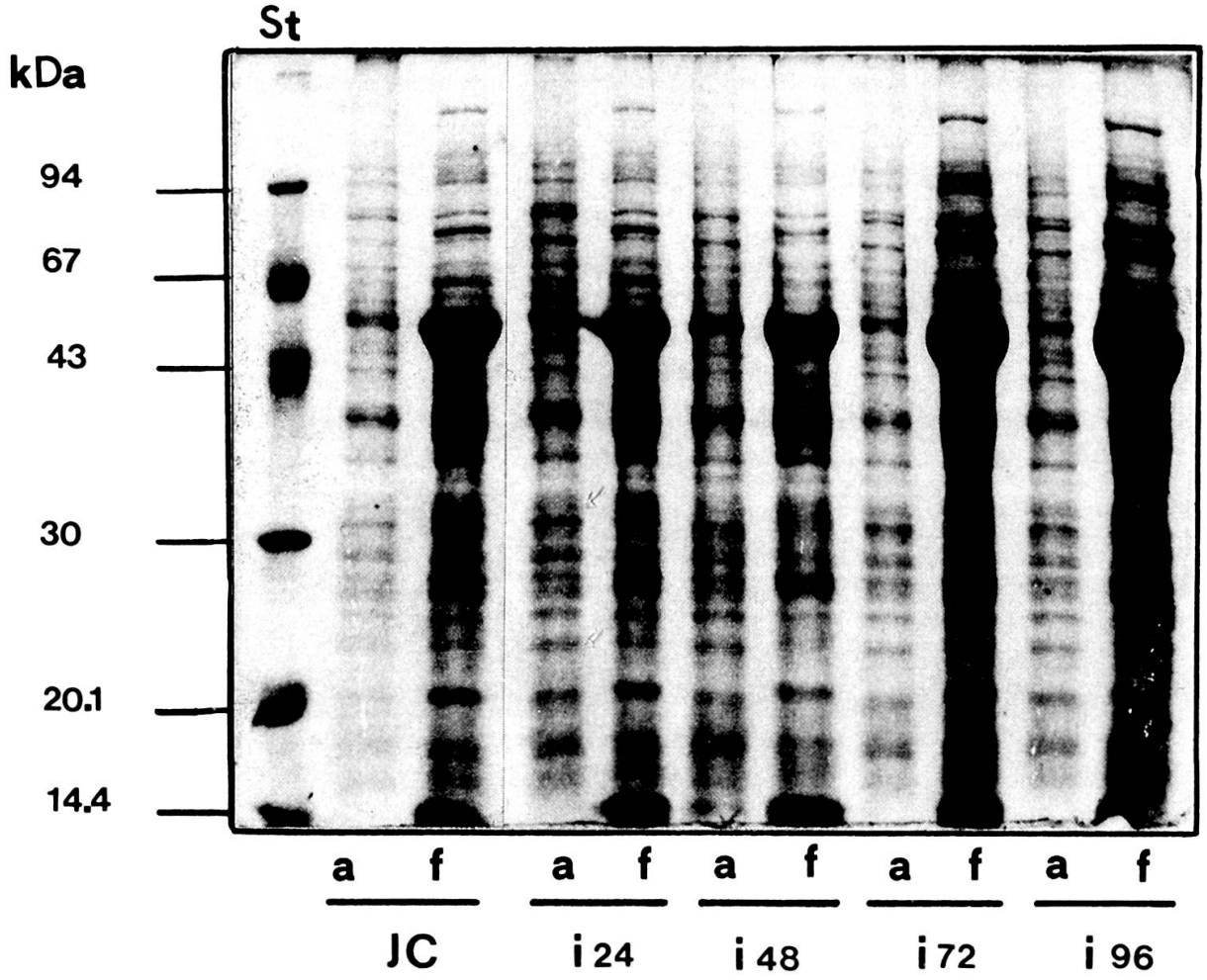


FIG. 1.

Electrophorégramme SDS-PAGE (5%-12.5%) de protéines solubles, colorées au bleu de Coumassie, de feuilles et d'apex d'épinards de JC et induits. Les quantités chargées sont de 0.01 mg pour les apex et de 0.02 mg pour les feuilles. a: protéines d'apex, f: feuilles, JC: jour court, i24: induit 24 heures, i48: induit 48 heures, i72: induit 72 heures, i96: induit 96 heures.

Ce type d'analyse est gêné, pour les échantillons de feuilles, par la grosse sous-unité de la ribulose 1.5. bisphosphate carboxylase (Rubisco) et ne permet d'analyser qu'environ 24 bandes protéiques dans l'apex et 33 bandes dans la feuille. Chez l'épinard, cette méthode ne permet pas de mettre en évidence des modifications du contenu en protéines de l'apex, dans les 4 premiers jours qui suivent l'induction florale (Fig. 1.). Les travaux de KOHLI *et al.* (1980) utilisant ce même type de méthode avaient également été décevants. Nous nous sommes donc intéressés à trouver une méthode permettant de mettre en évidence et d'analyser les modifications pouvant affecter le spectre des ARNm après le transfert des épinards en conditions inductrices, dans les méristèmes de l'épinard. L'analyse est effectuée par l'examen de l'électrophorégramme des produits de traduction de ces ARNm. Dans un premier temps, nous avons tenté de purifier des

ARNm à partir d'apex induits et non-induits. La taille extrêmement réduite du méristème, ainsi que la méthode d'extraction des ARN, nous obligeaient à prélever une partie importante du tissu sous-jacent à l'apex et équivalent en volume à au moins cent fois le volume du méristème.

Cette façon d'obtenir des fractions d'ARN enrichies en ARNm de méristème d'épinards s'est révélée longue et fastidieuse, et peu satisfaisante en raison des faibles quantités d'ARNm purifiés sur Oligo-dT cellulose que nous pouvions traduire *in vitro* dans la fraction S30 de l'extrait de germe de blé, selon la méthode utilisée par DEIKMAN *et al.* (1985). Nous avons donc abandonné le schéma classique, extraction d'ARN totaux-purification sur Oligo-dT cellulose-traduction *in vitro* dans un milieu acellulaire, après une phase d'essais décevants, pour explorer d'autres voies plus appropriées à notre type de matériel.

Traduction in vitro *dans le lysat de protoplastes*

Pour éviter donc l'étape délicate de la purification d'ARNm, et toujours dans le but d'analyser les produits de traduction néosynthétisés dans le méristème d'épinards, avant et après l'induction florale, nous avons tenté une autre approche, inspirée des travaux de ZWAR & HOOLEY (1986). Ceux-ci étudiaient la transcription du gène de l'α amylase dans des protoplastes de la couche à aleurone chez l'avoine *Avena fatua* L. Cette approche consistait à prélever des méristèmes d'épinards et de les faire incuber en présence d'enzymes digérant les parois pour obtenir des protoplastes. La méthode de préparation s'est montré suffisante pour fournir un rendement d'environ 2.10^6 cellules d'apex d'épinards à partir de 60 à 80 méristèmes d'épinards, représentant un poids frais de 30 mg environ. Ces protoplastes se présentent comme de petites cellules avec un noyau important (Fig. 2.). Les protoplastes sont filtrés et lavés pour les débarrasser des morceaux de tissu non-digéré, des débris cellulaires et des enzymes de digestion. Ils sont ensuite resuspendus dans un milieu aqueux, qui a été défini d'après le milieu de traduction *in vitro* dans le germe de blé (DEIKMAN *et al.*, 1985). Ce dernier a été modifié pour nos conditions d'expériences selon les prescriptions de MARKU & DUDOCK (1974).

La figure 3 présente le résultat d'une telle traduction dans le lysat de protoplastes d'apex d'épinards. La méthode permet d'analyser une trentaine de protéines marquées radioactivement donc néosynthétisées. On remarquera de plus que le profil électrophorétique de ces protéines est différent de celui des protéines froides d'apex tel qu'il est montré sur la figure 1.

La preuve de l'incorporation de la radioactivité dans les protéines est apportée par l'adjonction de ribonucléase au milieu de traduction. Cet antibiotique inhibe totalement la synthèse des protéines à partir des ARN du méristème (Fig. 3.). La stabilisation du pH par l'addition d'HEPES-KOH pH 7.6 à une concentration finale de 0.1 M favorise la synthèse de protéines, si l'on compare cette synthèse à la traduction dans un lysat de protoplastes non tamponné. Le pH du lysat de protoplastes non tamponné est d'environ pH 5.0.

FIG. 2.

Observation microscopique de protoplastes d'apex d'épinards en contraste de phase (x 1600).

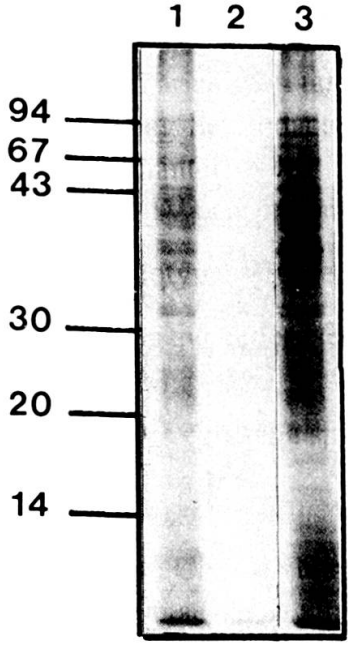


FIG. 3.

Fluorographie d'un électrophorégramme SDS-PAGE (5%-12.5%) de protéines traduites dans le lysat de protoplastes d'apex d'épinards. La charge radioactive est de 20 000 cpm par échantillon. 1. traduction dans un lysat à pH 5.0; 2. traduction dans un lysat à pH 5.0 en présence de ribonucléase pancréatique de bœuf à une concentration de 0.1 mg/ml; 3. traduction dans un lysat tamponné par HEPES-KOH 0.1 M pH 7.6.

Sur la figure 4, sont montrés les profils électrophorétiques des protéines néosynthétisées dans des lysats de protoplastes d'apex d'épinards cultivés en JC et induits par 24 heures de lumière continue. Les différences entre ces deux conditions de culture se manifestent, parmi les protéines traduites dans le lysat de protoplastes d'apex, par l'apparition de deux bandes correspondant à deux protéines de masses molaires apparentes, respectivement, de 32 kDa et 38 kDa, et d'autre part par l'augmentation quantitative d'une bande protéique de masse molaire apparente de 36 kDa ainsi que la diminution quantitative d'une bande de 25 kDa, ceci lorsque l'on compare le profil induit au profil non induit (Fig. 4.).

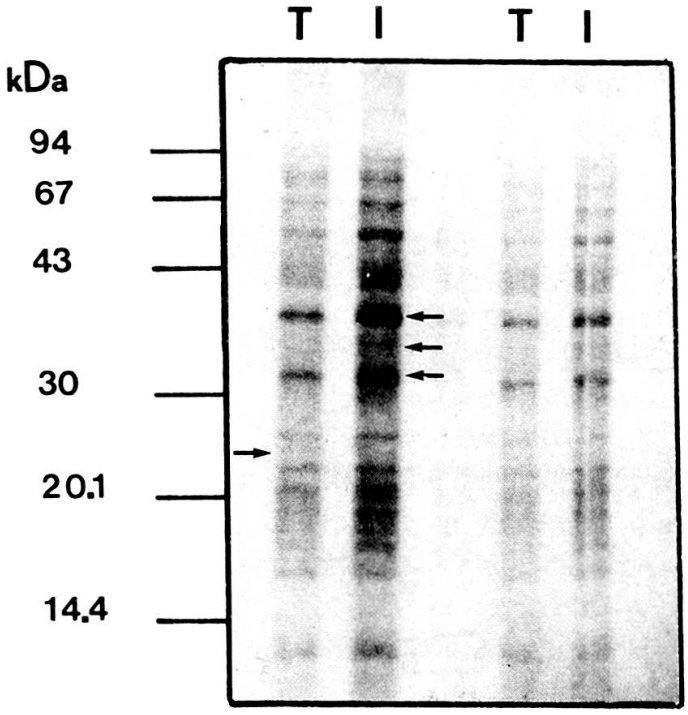


FIG. 4.

Fluorographie d'un électrophorégramme SDS-PAGE (5%-12.5%) de protéines traduites dans des lysats de protoplastes d'apex de JC et induits par transfert en lumière continue pendant 24 heures. Les quantités de radioactivité dans les 2 premiers puits sont de 40 000 cpm et de 20 000 cpm dans les deux autres puits. T. épinards de JC, I. épinards induits pendant 24 heures.

Traduction in vivo *dans les protoplastes d'apex*

La méthode mise au point au paragraphe ci-dessus, si elle est intéressante pour visualiser quelques modifications polypeptidiques parmi les protéines néosynthétisées après l'induction florale dans l'apex de l'épinard, donc la transcription de nouveaux ARNm, est toutefois délicate et fastidieuse. Nous avons donc cherché des raccourcis pour obtenir le même résultat. La première modification que nous avons apportée à notre méthode a été d'incuber directement les protoplastes d'apex dans un milieu aqueux contenant l'acide aminé radioactif.

Ce milieu aqueux, composé de la même façon que le milieu de digestion, mais sans les enzymes hydrolytiques, permettait donc de garder les mêmes conditions d'osmolarité que pendant la digestion. La présence de calcium à une concentration finale de 1mM s'est révélée précieuse, car on a remarqué que l'incorporation de méthionine S^{35} dans les protéines était notablement plus importante en présence de calcium qu'en son absence. Le rôle de ce calcium peut être soit de favoriser la perméabilité membranaire des protoplastes vis à vis de la méthionine, soit d'activer la traduction, en activant ou réprimant les activités d'enzymes intervenant dans cette dernière.

Les protoplastes intacts, après avoir été resuspendus dans le milieu d'incubation contenant la méthionine radioactive, sont incubés pendant une heure à température ambiante dans un volume total de 0.1 ml. Comme le montre la figure 5, le spectre des protéines néosynthétisées ne varie pas pendant la durée de l'incubation.

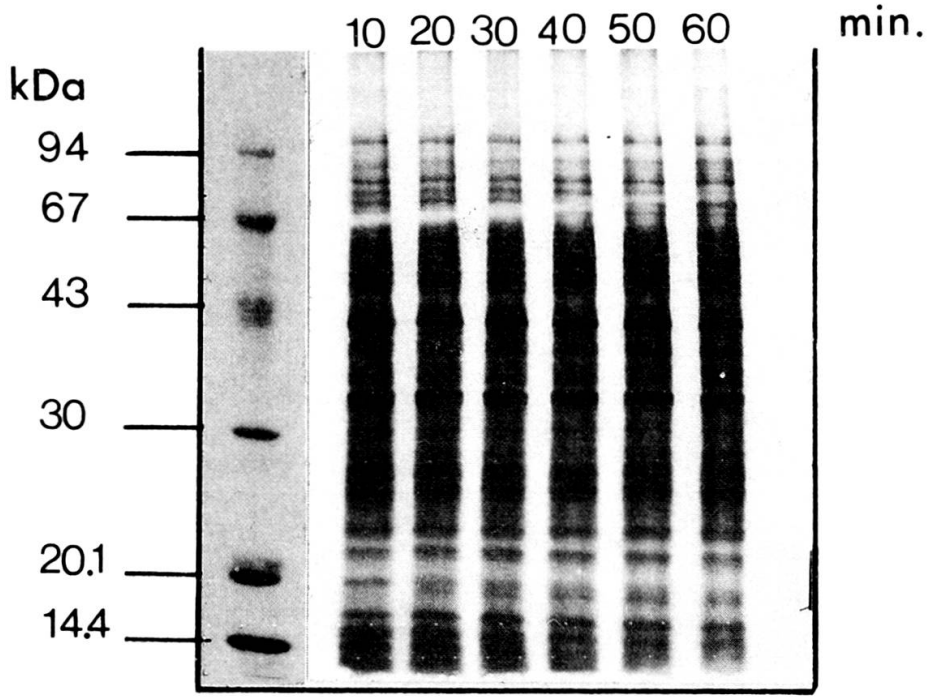
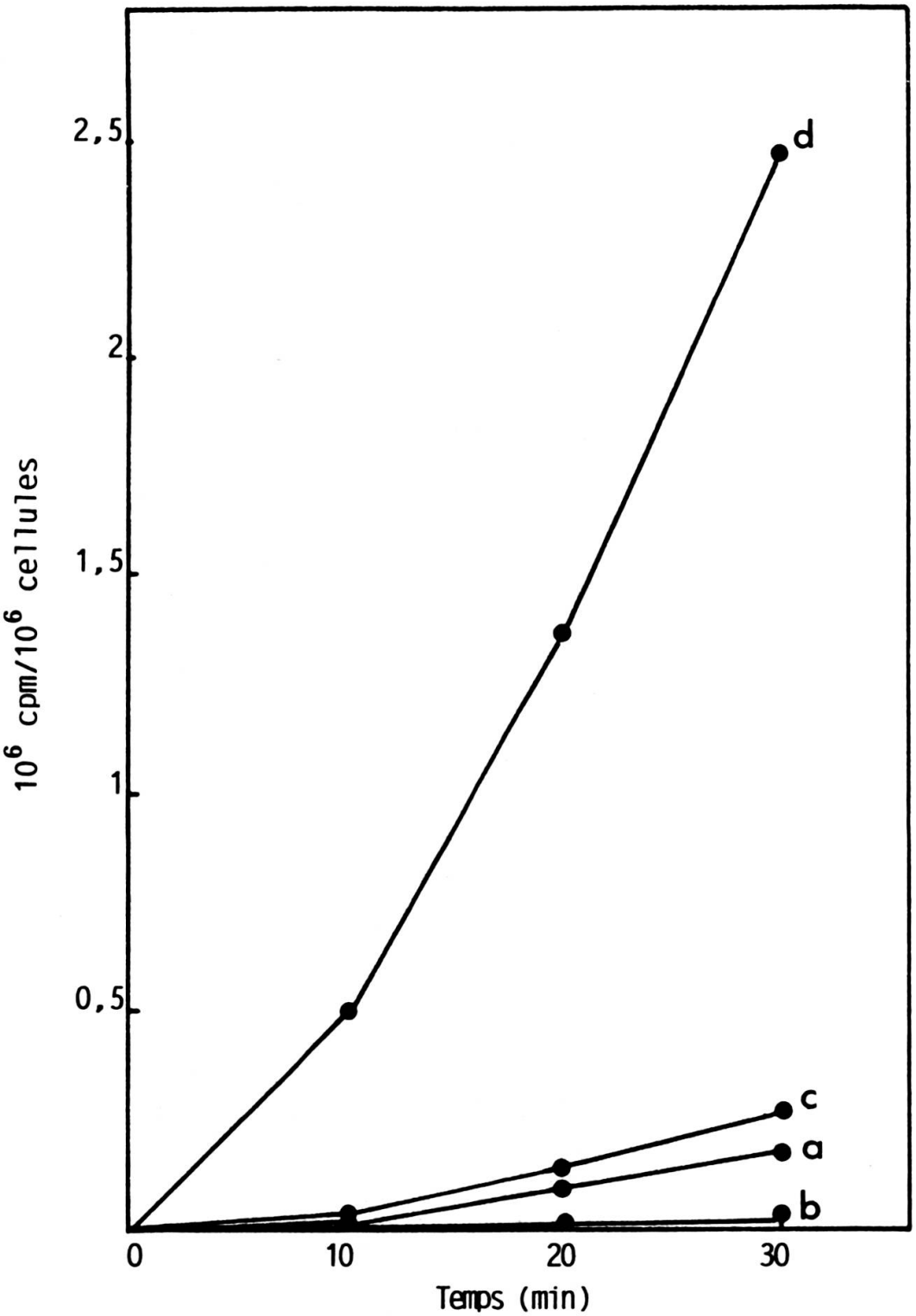


FIG. 5.

Fluorographie d'un électrophorégramme SDS-PAGE (5%-12.5%) de protéines traduites dans les protoplastes d'apex intacts en fonction du temps. Des aliquotes ont été prélevées toutes les 10 minutes pendant 1 heure dans le même lot de protoplastes incubés en présence de méthionine S^{35}. Les quantités de radioactivité chargées sont les mêmes pour chaque puits, c'est-à-dire 50 000 cpm. L'échelle de poids moléculaire est colorée au bleu de Coumassie.

Cette méthode a l'avantage sur la précédente de permettre l'obtention d'un taux d'incorporation de radioactivité supérieur, dans une proportion de 10 fois, à ceux obtenus dans le lysat de protoplastes. Nous avons également remarqué que l'addition de cordycépine (inhibiteur de la transcription) à une concentration finale de 0.025 mM

dans le milieu de digestion, pendant toute la durée de la digestion enzymatique, augmentait l'incorporation de la radioactivité. Les taux d'incorporation selon les conditions d'incubation sont présentés sur la figure 6. Celle-ci a été suivie par le prélèvement d'échantillons de 5 µ l du milieu de traduction, pendant l'incubation. Ces échantillons sont déposés sur des papiers filtres Whatmann 3MM (1 cm x 2 cm), précipités par de l'acide trichloacétique 10%.



L'électrophorégramme, présenté sur la figure 7, montre les profils polypeptidiques néosynthétisés de protoplastes d'apex d'épinards de JC et induits par transfert en lumière continue pendant 24 heures.

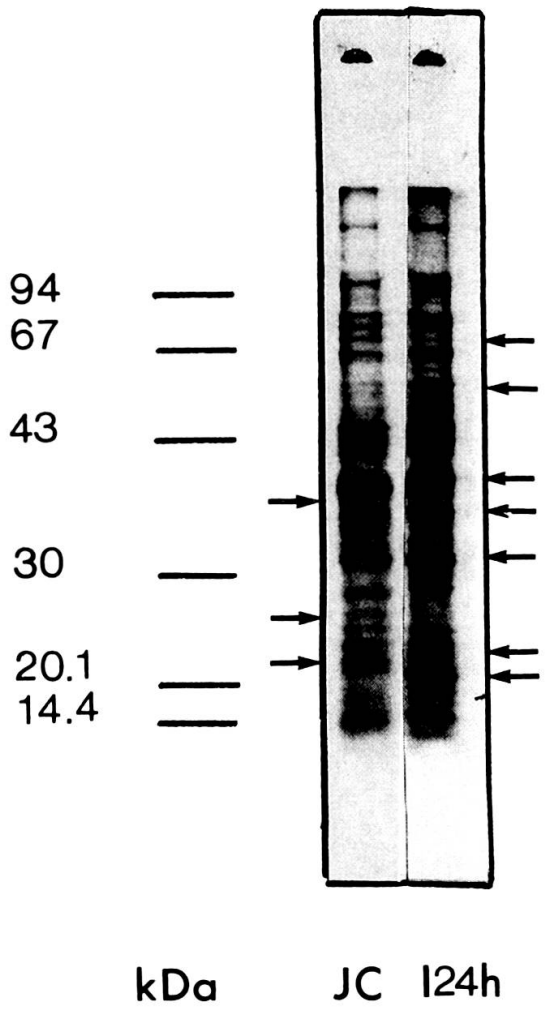


FIG. 7.

Fluorographie d'un électrophorégramme SDS-PAGE de protéines néosynthétisées, et marquées au soufre 35, dans les protoplastes intacts d'apex d'épinards induits et non induits. La quantité de radioactivité chargée est de 50 000 cpm par échantillon. JC. jour court, I 24 h. induit 24 heures.

Ils présentent, outre les mêmes modifications observées sur les profils de protéines traduites dans le lysat, quelques modifications supplémentaires et permettent de préciser les modifications observées dans le lysat.

FIG. 6.

Courbes d'incorporation de la méthionine radioactive dans les protéines traduites dans le lysat de protoplastes d'apex et dans les protoplastes d'apex intacts. a. traduction dans le lysat à pH 5.0; b. traduction dans le lysat à pH 5.0 en présence de ribonucléase pancréatique de bœuf à une concentration de 0.1 mg/ml; c. traduction dans le lysat à pH 7.6; d. traduction dans les protoplastes intacts.

L'apparition de deux protéines, de masses molaires apparentes de 32 et 38 kDa, semble plutôt être due à une augmentation quantitative du taux de synthèse de ces deux protéines qu'à une traduction nouvelle. Le nombre de protéines traduites dans les protoplastes est aussi plus important que dans le lysat de protoplastes, puisqu'on peut observer en moyenne 44 bandes protéiques dans les protoplastes intacts contre 33 bandes dans le lysat.

Au lieu de quatre modifications entre conditions végétatives et induites, on compte, dans les protoplastes intacts, 10 modifications. Six protéines, de masses molaires apparentes respectives 64, 38, 36, 32, 23 et 21 kDa, augmentent quantitativement alors que quatre autres protéines, qui affichent des masses molaires apparentes, respectivement de 77, 37, 26 et 22 kDa, diminuent quantitativement.

Quatre de ces modifications (38, 36, 32 et 26 kDa) sont assez semblables à celles observées dans le lysat de protoplastes (38, 36, 32 et 25 kDa). Pour permettre une comparaison plus aisée, les résultats des deux méthodes sont présentés dans le tableau 1.

Les différences de masse molaires apparentes peuvent trouver leur explication dans le fait que les modifications post-traductionnelles sont possibles dans les protoplates intacts et qu'elles ne le sont plus aussi efficacement dans le lysat, à cause du chaos moléculaire créé par la destruction de la structure cellulaire.

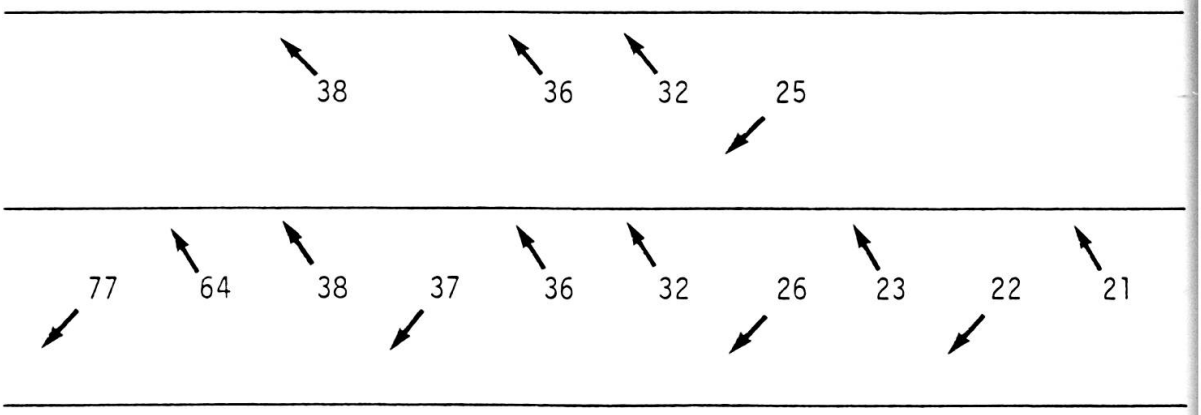


TABLEAU 1.

Récapitulation des modifications protéiques (en KDa) apparues, après induction, dans le lysat de protoplastes, et dans les protoplastes entiers. Les flèches ascendantes représentent une augmentation, les flèches descendantes une diminution.

DISCUSSION ET CONCLUSION

Par différentes méthodes, immunologiques (PIÉRARD *et al.*, 1977, 1980, MILYAEVA *et al.* 1982, KOVALEVA *et al.*, 1987) ou par électrophorèse bidimensionnelle (LYNDON *et al.* 1983, REMBUR *et al.* 1988, 1989, FRANCIS *et al.*, 1988), plusieurs chercheurs ont recherché et mis en évidence des modifications du spectre protéique dans l'apex de

plantes de JC comme de JL, lors de l'induction florale. Ces modifications, pour les plus précoces d'entre elles, étaient détectées par immunochimie.

Les modifications observables parmi les protéines accumulées, que ce soit par l'électrophorèse SDS-PAGE et alors révélées au bleu de Coumassie, ou par électrophorèse bidimensionnelle et révélées au nitrate d'argent n'étaient observées que tardivement en fin d'évocation florale.

Les différentes méthodes présentées ci-dessus montrent que des modifications quantitatives de protéines apparaissent lors de l'induction florale dans les cellules d'apex d'épinards, dans les premières heures de l'induction florale (une dizaine d'heures après le début de l'évocation florale). Si elles sont détectables parmi les protéines néosynthétisées, elles ne le sont pas en protéines froides. Ces cellules d'apex ont un potentiel élevé de synthèse des protéines, puisqu'aussi bien dans le lysat de protoplastes, dans les protoplastes intacts que dans les apex entiers, on obtient des taux d'incorporation de radioactivité décelables à partir de quantités réduites de matériel végétal (30 mg de PF pour les protoplastes, 5-7 mg de PF pour les apex entiers), et dans des temps d'incubation courts (30 à 60 minutes pour les protoplastes, 3 heures pour les apex entiers).

Le problème que posent ces incubations, est qu'elles sont relativement difficiles à standardiser, particulièrement pour les deux méthodes utilisant les protoplastes d'apex, qui sont un matériel délicat.

La variation dans le taux d'incorporation rapporté au nombre de protoplastes est sujet à une grande variabilité.

Les différences de température ambiante lors de la digestion enzymatique, les différences de lot à lot d'épinards, le nombre de manipulations successives auxquelles sont soumis les protoplastes semblent avoir une importance et altèrent la reproductibilité des expériences.

En conclusion, ces méthodes sont avantageuses pour obtenir des produits de traduction de tissus végétaux déterminés, lorsqu'on dispose seulement de quantités réduits de ces tissus, qui ne permettent pas d'utiliser la voie classique d'extraction d'ARN totaux, suivie de la purification des ARNm et de la traduction de ces ARNm dans un milieu acellulaire bien caractérisé tel que la fraction S30 de l'extrait de germe de blé.

Enfin, il semblerait qu'une dizaine d'heures au moins après le dépassement de la photopériode critique pour l'induction de la floraison de l'épinard, le traitement lumineux implique une modification des taux de synthèse d'au moins 4 et d'au plus 10 protéines dans l'apex de l'épinard, modifications qui restent suffisamment discrètes, d'une point de vue quantitatif, puisqu'elles ne peuvent être détectées au niveau des protéines accumulées colorées au bleu de Coumassie. Une de ces protéines (38kDa) est d'une masse molaire apparente similaire à celle dont le taux de synthèse variait dans l'épiderme inférieur de la feuille, après un traitement photopériodique identique (LEFORT *et al.*, 1991).

BIBLIOGRAPHIE

BONNIER, G. & DOUIN, R. (1990). La grande flore de France en couleurs. Ed. Belin, Paris. ISBN 2-603-00735-1.

DEIKMAN, J. & JONES, R. (1985). Control of a amylase mRNAaccumulation by gibberellic acid and calcium in barley aleurone layers. Plant Physiol. 78: 192-198.

FRANCIS D., REMBUR, J. & NOUGAREDE, A. (1988). Changement dans la composition polypeptidique du méristème de *Silene coeli-rosa* L. au cours de l'induction florale. C.R. Acad. Sci. Paris 307 (Ser. III): 763-770.

GREPPIN, H., AUDERSET, G. BONZON, M., DEGLI AGOSTI, R., LENK, R. & PENEL, C. (1986). Le mécanisme de l'induction florale. Saussurea 17: 71-84.

GREPPIN, H., AUDERSET, G., BONZON, M., DEGLI AGOSTI, R. & PENEL, C. (1986). Flowering and leaf-shoot interaction, in The Cell Surface in Signal Transduction. E. Wagner, H. Greppin, B. Millet, eds. pp. 157-168. NATO ASI Series, Springer-Verlag, Berlin. ISBN 3-540-18198-9.

KOHLI, R.K., SAWHNEY, N. & SAWHNEY, S. (1980). Photo-induced changes in proteins associated with floral induction in *Amaranthus*. Plant Cell Physiol. 91(8): 1483-1490.

KOVALEVA, L.V. & MILYAEVA, E.L. (1987). Specific proteins in stems meristems during transition to flowering. Biologia Plantarum 29(5): 395-398.

LAEMMLI, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 277: 680-685.

LEFORT, F., THIELLEMENT, H. & GREPPIN, H. (1991). Polypeptide pattern modification during the floral induction in leaves of *Spinacia oleracea*. Arch. Sci. Genève. 44:

LYNDON, R.F., JACQMARD, A. & BERNIER, G. (1983). Changes in protein composition of the shoot apex during floral evocation in *Sinapis alba*. Physiol. Plant. 59: 476-480.

MARKU, K. & DUDOCK, B. (1974). Characterization of a highly efficient protein synthesizing system derived from commercial wheat germ. Nucleic Acids Res. 1(11): 1385-1397.

MILYAEVA, E.L., KOVALEVA, L.V. & CHAILAKHYAN M.K. (1982). Formation of specific proteins in stem apices of plants in transition from vegetative growth to flowering. Sov. J. Plant Physiol. 29(1): 190-196.

NOVACK, F.J., HAVEL, L. & DOLEZEL, J. (1986). Allium. In Handbook of cell culture. D.A. Evans, W.R. Sharp & P.V. Ammirato, eds. Vol. IV pp. 419-456. McMillan Publishing Co., N.Y. ISBN 0-02-949230 (Vol. I).

REMBUR, J. (1988). Mini-électrophorèse bidimensionnelle d'extraits protéiques du méristème végétatif et reproducteur de *Chrysanthemum segetum* L. (Composées). C.R. Acad. Sci. Paris 307 (Ser. III): 75-81.

REMBUR, J. & NOUGAREDE, A. (1989). Changes in the polypeptide composition during the ontogenetic development of the shoot apex of *Chrysanthemum segetum* L. analysed by two-dimensional mini-gel electrophoresis. Plant Cell Physiol. 30(3): 359-363.

PIERARD, D., JACQMARD, A. & BERNIER, G. (1977). Changes in the protein composition of the shoot apical bud of *Sinapis alba* in transition to flowering. Physiol. Plant. 41: 254-258.

PIERARD, D., JACQMARD, A., BERNIER, G. & SALMON, J. (1980). Appearance and disappearance of proteins in the shoot apical meristem of *Sinapis alba* in transition to flowering. Planta 150: 397-405.

VINCE-PRUE, D. (1975). Photoperiodism in plants. McGraw Hill, Londres. ISBN 0-07-084048-2.

ZWAR, A.J. & HOOLEY, R. (1986). Hormonal regulation of a amylase gene transcription in wild oat (*Avena fatua* L.) aleurone protoplasts. Plant Physiol. 80: 459-463.

Manuscrit reçu le 24 février 1992