



Article scientifique

Article

1989

Published version

Open Access

This is the published version of the publication, made available in accordance with the publisher's policy.

Examen d'une plantule par la R.M.N

Degli Agosti, Robert; Lenk, Rudolf; Greppin, Hubert

How to cite

DEGLI AGOSTI, Robert, LENK, Rudolf, GREPPIN, Hubert. Examen d'une plantule par la R.M.N. In: Saussurea, 1989, vol. 20, p. 89–95.

This publication URL: <https://archive-ouverte.unige.ch/unige:42769>

Examen d'une plantule par la R.M.N.

ROBERT DEGLI AGOSTI
RUDOLF LENK
&
HUBERT GREPPIN

RÉSUMÉ

DEGLI AGOSTI, R., R. LENK & H. GREPPIN (1989). Examen d'une plantule par la R.M.N. *Saussurea* 20: 89-95. En français, résumés français et anglais.

La R.M.N. en régime pulsé a été utilisée pour déterminer la distribution de la dynamique moléculaire dans une plantule d'avoine étiolée. Les résultats ont montré que la fréquence de la dynamique moléculaire dans les feuilles, l'épicotyle et les racines est supérieure à celle observée dans les graines germées. Dans ces dernières, le temps de relaxation T1 dépend de l'état physiologique de la plantule.

ABSTRACT

DEGLI AGOSTI, R., R. LENK & H. GREPPIN (1989). The N.M.R. investigation of a seedling. *Saussurea* 20: 89-95. In French, French and English abstracts.

The pulse N.M.R. was used for the study of the molecular dynamics in the etiolated seedlings of oat. The results have shown that the frequency of the molecular dynamics in the leaves and in the roots is higher than in the grain where the T1 relaxation times depend on the physiological state of the seedling.

Introduction

L'importance de la résonance magnétique nucléaire (R.M.N.) pour la recherche biologique et médicale est bien établie (LENK & al., 1979; LENK, 1984; MARTIN, 1985; LENK, 1986). L'intérêt de cette méthode est surtout son caractère non destructif. Elle peut permettre de mesurer la distribution spatiale de la dynamique moléculaire dans le système étudié (Imagerie en R.M.N.).

L'activité biologique est étroitement liée avec la dynamique moléculaire dans un système vivant. Elle peut être étudiée par la mesure des temps de relaxation T1 et T2 (LENK, 1986). La dynamique moléculaire rapide est déterminée par la "température moléculaire" et par l'énergie d'activation E du système (LENK, 1986). Ce qui signifie que la variation du temps de relaxation T1 est décrite par la statistique de Boltzmann:

$$T1 = \text{const.exp}(-E/kT) \quad (1)$$

où k est la constante de Boltzmann et T est la température en degré Kelvin.

Dans ce contexte, nous avons défini un domaine de la "biodynamique" en étudiant les aspects physiologiques des mouvements moléculaires (LENK, 1984) et avons également démontré (LENK & al., 1981, 1987) que l'entropie des fluctuations S est proportionnelle au temps de relaxation T_1 (traduite par la mobilité des molécules d'eau)

$$S_f = \text{const.} T_1 \quad (2)$$

La signification de cette approche est simple: puisque l'entropie détermine le degré d'incertitude (désordre) du système, l'augmentation du temps de relaxation T_1 diminue la transparence du phénomène.

Dans ce travail, nous décrivons une nouvelle tête de mesure R.M.N. qui nous permet de mesurer la distribution uni-dimensionnelle de la dynamique moléculaire dans une plantule. D'autre part, la puissance de l'émetteur de l'appareil existant (LENK & al., 1984) a été augmentée par la construction d'un nouvel amplificateur.

Matériel et méthodes

Matériel végétal

Les graines d'avoine (*Avena sativa* L. cv. Garry) sont mises à germer à l'obscurité totale dans de la vermiculite humidifiée avec de l'eau distillée et déionisée. Le matériel est utilisé après 6 jours de culture (144 h). La température est constante à $22 \pm 2^\circ\text{C}$. Les mesures par la R.M.N. sont effectuées sur des fragments isolés ou sur des plantules entières, placées dans des tubes R.M.N. standard de 5 mm. Comme nous n'avons observé aucune différence entre les mesures effectuées sur des fragments de plantules ou des graines isolées et celles sur la plantule entière, nous avons donc groupé toutes les valeurs de relaxation pour un tissu donné. Le poids sec est obtenu après déshydratation, pendant 24 h dans une étuve à 95°C . La teneur en amidon a été appréciée visuellement: la graine germée, dépourvue de son enveloppe, a été broyée dans de l'eau (1 ml) grâce à un mortier. Une goutte de réactif iodé (2g KI, 1g I₂ dans 300 ml d'eau) est ajoutée à l'extrait. La présence d'amidon est clairement visible par une coloration bleu-violette spécifique.

Appareillage

La tête de mesure, décrite dans l'article précédent (LENK & al., 1984) n'était pas adéquate pour les mesures sur les plantes entières. Nous avons donc construit une nouvelle tête avec des bobines croisées (tête de Bloch). La bobine de réception d'une longueur de 4 mm contourne l'éprouvette R.M.N. La bobine d'émission est de type Helmholtz, son axe étant perpendiculaire à la bobine de réception (voir figure 1). Dans ce cas, le champ radioélectrique est homogène dans l'espace de l'échantillon et le "coefficient de remplissage" de l'échantillon est amélioré. Cette configuration s'est révélée idéale pour les études des plantules d'avoine. La graine s'introduit aisément dans l'éprouvette de 5 mm où on peut facilement la placer au centre de la bobine de réception, en cherchant le maximum du signal.

Cependant, cette modification expérimentale nécessite l'augmentation de la puissance du champ de radiofréquences. Dans notre cas, l'amplificateur commercial, type ZHL-3A de Mini-Circuits (New York), délivrant une puissance de 1 W, est suivi par un amplificateur à tubes, délivrant une puissance totale de 15 W environ. Ce montage "push-pull" est équipé par une double tétrode QQE06/40 (Philips), ou par deux pentodes 6417 (RCA) (fig. 2). Cet étage amplificateur est modulé par des impulsions provenant d'un programmeur digital qui produit la séquence d'impulsions carrées pour la mesure des temps de relaxation T_1 et T_2 (voir aussi LENK & al., 1984).

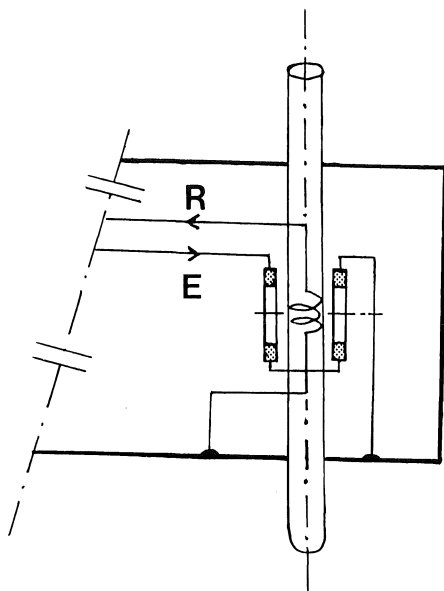
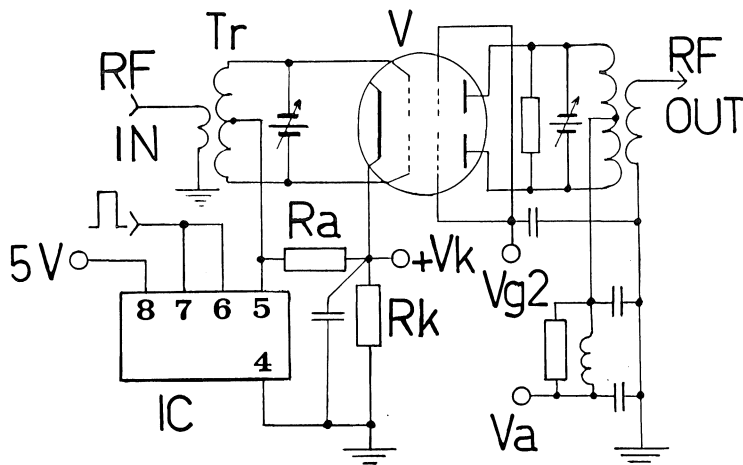


Fig. 1. — Tête de mesure R.M.N. avec deux bobines croisées. **R**: bobine de réception; **E**: bobine d'émission.

Fig. 2. — Amplificateur pour la R.M.N. pulsée. **V**: double tétrode QQE06/40 (ou deux pentodes 6417, RCA). **Tr**: transformateur accordé. **IC**: circuit intégré SN 75741 (positive-AND driver, Texas Instruments). **Ra** et **Rk**: 1 kOhm.



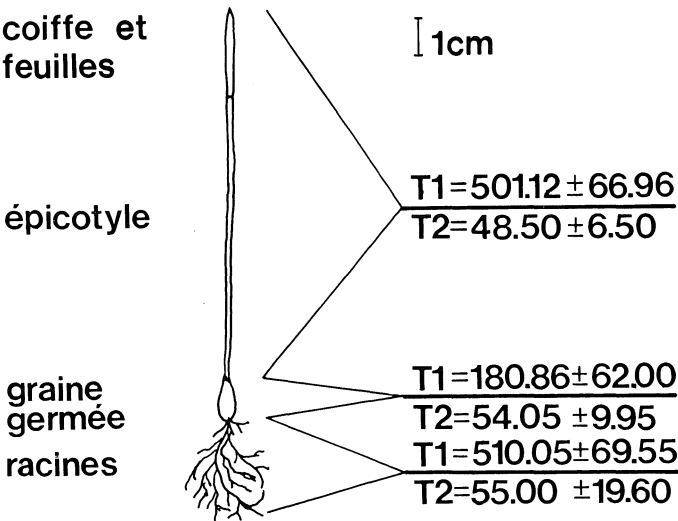
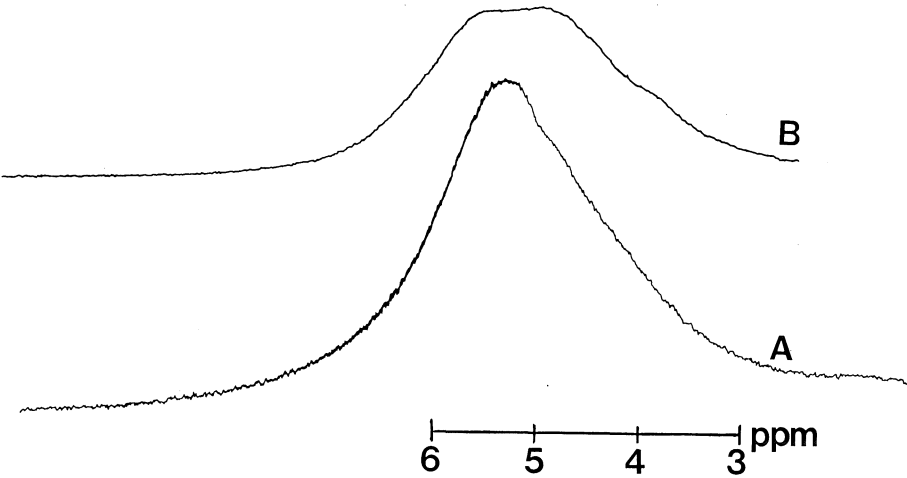


Fig. 3. — Distribution des temps de relaxation T1 et T2 (en ms) dans une plantule d'avoine. Les teneurs en eau (% du poids frais) sont les suivantes: feuilles et épicotyles (94.22 ± 0.26), graine germée (71.71 ± 3.68) et racine (94.79 ± 0.45).

Fig. 4. — Spectres R.M.N. à 60 MHz des protons aqueux. **A:** dans la graine germée d'avoine. **B:** dans les feuilles d'avoine.



Le temps de relaxation longitudinale T_1 a été mesuré par la séquence de deux impulsions 180° - τ - 90° . La relaxation transversale T_2 a été déterminée par l'écho de spin, en utilisant la séquence d'impulsions 90° - τ - 180° .

Les spectres R.M.N. des protons aqueux ont été mesurés sur l'appareil de Perkin-Elmer-Hitachi à 60 MHz et ceux du phosphore (P-31) ont été mesurés sur l'appareil WM-200 de Bruker (Karlsruhe) à la fréquence de 81 MHz.

Résultats

On peut globalement observer que les valeurs de T_1 sont très variées. Elles dépendent de l'état physiologique de la plantule et du tissu utilisé. Par contre, les valeurs de T_2 sont assez constantes: pour les feuilles et les épicotyles nous avons obtenu $T_2 = 48.55 \pm 6.50$ ms, pour les racines $T_2 = 55.01 \pm 19.6$ ms et pour les graines $T_2 = 54.05 \pm 9.95$ ms.

La radiographie de la plantule entière a montré que la relaxation T_1 est supérieure dans les feuilles et épicotyles (501.12 ± 66.96 ms) et dans les racines (510.05 ± 69.55 ms) que dans les graines germées (180.86 ± 62.00 ms, voir aussi la figure 3). Les moyennes ont été déterminées à partir de 30 échantillons.

Dans ce travail, nous nous sommes intéressés plus particulièrement aux graines germées où la situation est plus compliquée, compte tenu de l'évolution physiologique de la plantule. Dans quelques cas, les temps T_1 sont plus longs ou plus petits que la moyenne de 180.8 ms. Nous avons pu vérifier par une méthode chimique que la variation de T_1 est corrélée avec la présence d'amidon. En effet, pour un T_1 petit, nous avons pu observer une abondante présence d'amidon et l'inverse lorsque T_1 est élevé.

Le spectre R.M.N. des protons aqueux dans la graine germée est déterminé par une bande spectrale, large et asymétrique (fig. 4A), tandis que dans les feuilles on a un doublet, mal résolu (fig. 4B).

Le spectre R.M.N. du phosphore (31-P) dans la graine germée est déterminé par une bande spectrale symétrique, centrée à -0.09 ppm par rapport à H_3PO_4 (fig. 5). Cette raie correspond aux orthophosphates inorganiques (Pi). Le centre de la raie nous permet de déterminer un pH moyen de 6.82. Par contre, pour les graines non germées, les bandes spectrales R.M.N. sont très larges et non mesurables.

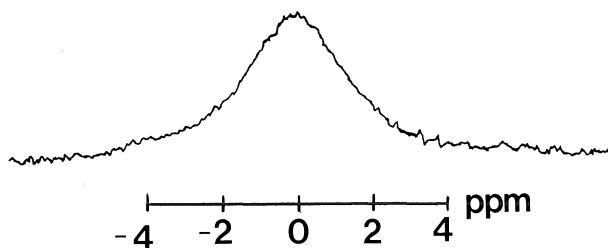


Fig. 5. — Spectre R.M.N. du 31-P (81 MHz, 900 scans) dans la graine germée d'avoine.

Conclusion

Différents travaux ont été effectués sur les graines grâce à la R.M.N., mais plus particulièrement avec la 31-C R.M.N. (par exemple COLNAGO & SEIDL, 1983; RUTAR & BLINC, 1980; SCHAEFER & STEJSKAL, 1974 et l'article de revue de MARTIN, 1985). Cependant, peu ont utilisé la technique 1-H R.M.N. A ce propos nous pouvons citer les travaux de GRANGE & al. (1980) et de ISHIDA & al. (1987), qui se sont intéressés à la maturation des graines. En ce qui concerne la germination, cette technique a été utilisée, par exemple, dans une étude très récente des effets des teneurs initiales d'eau sur la dynamique d'imbibition des graines de haricot (WOLK & al., 1989). Le présent travail constitue donc une approche préliminaire originale de l'étude de la germination par la 1-H R.M.N.

Dans notre travail nous avons montré que la relaxation longitudinale (T1) est plus sensible à la nature du tissu mesuré et à l'état de la graine germée que la relaxation transversale (T2). Dans ce contexte, il faut rappeler que le temps T1 reflète la dynamique rapide du système, tandis que le temps T2 contient un mélange d'informations sur les mouvements rapides, lents et les interactions statiques de l'eau. Par conséquent, les temps T1 sont davantage sensibles aux variations des énergies d'activation E.

Le principal constituant des graines d'avoine est l'amidon (50 à 63% du poids frais, WHELAN, 1955). Celui-ci est composé d'amylose (PM 20.000 à 200.000) et d'amylopectines (PM 200.000 à 2 millions), tout deux étant des polymères de molécules de glucose (p.ex. RICHTER, 1978). Durant la germination, ces polymères sont dégradés en composés de plus faible poids moléculaire (200 à 2000), puis transformés en saccharose; ce dernier étant la molécule qui est exportée hors de la graine vers les tissus en formation (p.ex. BIDWELL, 1979). Ainsi, dans la graine d'avoine en germination, non seulement la teneur en eau, mais également sa dynamique moléculaire doivent largement être tributaires de la présence d'amidon et du degré de polymérisation-dépolymérisation de celui-ci. La mesure de T1 constitue donc un reflet de cet état physiologique. Ces considérations sont illustrées dans notre cas par le fait qu'une présence élevée d'amidon se traduit effectivement par un temps de relaxation T1 plus petit, l'inverse étant également vérifié.

Grâce à cette approche, nous pouvons donc envisager de doser *in vivo* la dynamique d'utilisation de l'amidon par la 1-H R.M.N. lors de la germination des graines.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- BIDWELL, R. G. S. (1979). *Plant Physiology*, 2nd ed. Macmillan Publishing Co., Inc., New York.
- COLNAGO, L. A. & P. SEIDL (1983). Application of carbon-13 NMR to the germination of soybean seeds in-vivo. *J. Agric. Food Chem.* 31: 459-461.
- GRANGE, A., A. DUPANLOUP, P. DESCOUTS & G. BENE (1980). Evolution du temps de relaxation spin-réseau, T1, des protons de l'eau biologique au cours de la maturation des graines de haricot. *Compt. Rend. Hebd. Acad. Sci. Paris* 291: 307-309.
- ISHIDA, N., N. KANO, T. KOBAYASHI, H. HAMUGUSHI & T. YOSHIDA (1987). Estimation of biological activities by NMR in soybean seeds during maturation. *Agric. Biol. Chem.* 51: 301-307.
- LENK, R. (1984). Biodynamics and NMR. *Progr. Nucl. Med. (Karger, Basel)* 8: 55-61.
- LENK, R. (1986). *Fluctuation, diffusion and spin relaxation*. Elsevier, Amsterdam.
- LENK, R., M. BONZON, P. DESCOUTS & H. GREPPIN (1979). La résonance magnétique nucléaire, une approche nouvelle en biologie végétale. *Saussurea* 10: 11-48.
- LENK, R., M. BONZON & H. GREPPIN (1981). Irreversible thermodynamics and biological evolution in spinach leaves, as studied by NMR. *Z. Pflanzenphysiol.* 101: 107-118.
- LENK, R., P. CRESPI & H. GREPPIN (1987). Evolution de l'entropie et de la néguentropie en biologie. *Arch. Sci. Genève* 40: 351-362.

- LENK, R., A. DUPANLOUP, P. DESCOUTS & H. GREPPIN (1984). Réalisation d'un spectromètre R.M.N. pour l'étude des végétaux. *Saussurea* 15: 25-31.
- MARTIN, F. (1985). Monitoring plant metabolism by $^{13}\text{-C}$, $^{14}\text{-N}$ and $^{15}\text{-N}$ NMR spectroscopy. A review of the applications to algae, fungi and higher plants. *Physiol. Vég.* 23: 463-490.
- RICHTER, G. (1978). *Plant metabolism*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart.
- RUTAR, V. & R. BLINC (1980). Non destructive determination of protein content of viable seeds by proton enhanced $^{13}\text{-C}$ NMR. *Z. Naturf.* 35: 12-15.
- SCHAEFFER, J. & E. O. STEJSKAL (1974). Determination of oil, starch and protein content of viable intact seeds by $^{13}\text{-C}$ NMR. *J. Amer. Oil Chem. Soc.* 51: 562-563.
- WHELAN, W. J. (1955). Starch, Glycogen, Fructosans and similar polysaccharides. In: PEACH, K. & M. V. TRACEY (éds.). *Moderne Methoden der Pflanzenanalyse* 2: 145-196. Springer, Berlin.
- WOLK, W. D., P. F. DILLON, L. F. COPELAND & D. R. DILLEY (1989). Dynamics in imbibition in *Phaseolus vulgaris* L. in relation to initial seed moisture content. *Pl. Physiol.* 89: 805-810.