N° d'ordre : 698 50376 1978 11

## THESE

présentée à

50376 1978 11

L'UNIVERSITÉ DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE I

pour obtenir le titre de

DOCTEUR DE 3ÈME CYCLE

SPÉCIALITÉ BIOCHIMIE

par

CHRISTIANE DELBART

## EVOLUTION DES GLYCOSPHINGOLIPIDES CHEZ

## PETUNIA HYBRIDA,

ESPECE AUTO INCOMPATIBLE JARRES POLLINISATION



Présentée le 25 juillet 1078

devant la Commission d'Examen

Membres du Jury :

Μ.	R.	LINDER	Président
Mlle	D.	COUSTAU'I	Rapporteur
М.	J.	MONTREUIL	Examinateur
Μ.	Y.	MOSCHETTO	Examinateur
м.	H.F.	LINSKENS	Examinateur

Au Président de Thèse

Monsieur R. LINDER Professeur de Cytogénétique et d'Ecologie Université des Sciences et Techniques de Lille

Aux Membres de mon Jury

Mademoiselle D. COUSTAUT Professeur de Biologie et de Physiologie végétales U.E.R. de Pharmacie

Monsieur J. MONTREUIL Professeur de Biochimie Université des Sciences et Techniques de Lille

Monsieur Y. MOSCHETTO Docteur ès-Sciences, Directeur du Centre de Technologie Biomédicale de Lille

Monsieur H.F. LINSKENS Professeur de Botanique, Directeur de l'Institut botanique de la Faculté Catholique des Sciences de la Nature de Nimègue (Hollande)

Au terme de ce travail, il m'est agréable de témoigner ma respectueuse reconnaissance aux Membres de mon Jury de Thèse et aux Maîtres dont j'ai reçu l'enseignement et les précieuses directives. Ce travail a été réalisé dans le Laboratoire de Physiologie végétale de la Faculté de Pharmacie de Lille, sous la direction de Mademoiselle le Professeur D. COUSTAUT, en étroite collaboration avec Monsieur le Professeur H.F. LINSKENS qui nous a fourni le matériel génétique, Monsieur B. FOURNET, Maître de Conférence, qui nous a aidée pour la détermination de la partie osidique, Monsieur BRIS, Maître Assistant, qui nous a aidée tout le long de ce travail et le Centre de Technologie Biomédicale du Docteur Y. MOSCHETTO auquel le Laboratoire est associé. Cette association a été parrainée par Monsieur le Professeur R. LINDER.

Que tous ceux qui m'ont aidée et encouragée dans la réalisation de ce travail, trouvent ici l'expression de mes très vifs remerciements.

## TABLE DES MATIERES

	page
INTRODUCTION	1
CHAPITRE I : Généralités sur les glycosphingolipides. Etat de nos	
connaissances actuelles	23
<u>CHAPITRE II</u> : Matériel d'étude	40
	• •
CHAPITRE III : Analyse des glycosphingolipides totaux	41
CHAPITRE IV : Analyse des glycosphingolipides neutres et acides	51
CHAPITRE V : Isolement et évolution des divers glycosphingolipides	
neutres	63
CHAPITRE VI : Analyse des constituants des glycosphingolipides neutres.	71
DISCUSSION ET CONCLUSION	108
BIBLIOGRAPHIE	126

Un plan détaillé est donné en tête de chaque chapitre.

#### INTRODUCTION

- Les glycosphingolipides	1
1 - Glycosphingolipides et structure membranaire	2
2 - Glycosphingolipides et propriétés membranaires	2
· ·	
- Incompatibilité de fécondation	3
	U
I - Définition des barrières de fécondation	4
1 – Localisation au niveau du stigmate	5
2 – Localisation au niveau du style	5
3 – Localisation au niveau de l'embryon	6
II - Déterminisme génétique	6
1 - Autoincompatibilité gamétophytique de fécondation	6
2 - Autoincompatibilité sporophytique de fécondation	7
III - Physiologie de l'incompatibilité	8
1 – Relations avec la respiration	8
2 - Relations avec le métabolisme des hydrates de carbone	9
3 - Relations avec le métabolisme protéique	9
4 - Relations avec le métabolisme lipidique	11
IV - Conceptions actuelles concernant les relations pollen - stigmate -	
<i>style</i>	14
V - Surface pollinique et réaction d'incompatibilité	14
1 - Rappel de l'architecture de la paroi pollinique	14
2 - Dépôt et émission des protéines du pollen	16
3 - Localisation et identification des protéines émises	17

VI – Su	rface stigmatique et reaction d'incompatibilite
	1 – Les stigmates humides
	2 – Les stigmates secs

•

.

•

د . . .

\_00\_00\_00\_00\_

#### INTRODUCTION

#### - LES GLYCOSPHINGOLIPIDES -

Les glycosphingolipides forment une classe de lipides caractérisés par une grande complexité structurale mais aussi par le caractère énigmatique de leurs fonctions (d'où l'étymologie de leur nom).

Les méthodes de fractionnement, de chromatographie en phase gazeuse et de spectroscopie de masse, ont démontré la grande hétérogénéité de ces lipides. Cette hétérogénéité repose en effet sur la juxtaposition dans leur molécule, de 3 constituants : sphingosine ou base à longue chaîne (LCB : diol aminé ou l'un de ses analogues), acides gras (AG) et hydrates de carbone (sauf dans les céramides). Cette complexité structurale est accrue par la variabilité de ces constituants et par la présence de divers résidus sulfuriques ou phosphoriques.

Les glycosphingolipides ont été identifiés chez les végétaux par CARTER (1969). Un grand pas dans la connaissance de ces composés est apporté par de nombreux travaux qui s'attachent à élucider la structure de leur copule osidique (SHAPIRO, 1969), la nature des bases à longue chaîne (KARLSSON, 1971) et également à définir leurs éventuelles propriétés biologiques (RAPPORT et GRAF, 1969).

#### 1 - Glycosphingolipides et structure membranaire :

Si l'implication de ces lipides dans la structure des membranes vivantes est un fait bien établi, il n'en est pas de même quant à leur participation aux multiples activités physiologiques reconnues aux membranes animales et végétales. Cependant, ces dernières années sont marquées par un grand progrès dans ce domaine de la biologie où s'est imposé un nouveau mode de raisonnement pour les biochimistes préoccupés par une meilleure connaissance de l'édifice moléculaire et des activités membranaires qui lui sont associées. Ils raisonnent en effet de plus en plus en "fractions polaires et apolaires" qui résultent de l'arrangement, de la distribution des charges électriques sur un ensemble plurimoléculaire. Ainsi, la localisation et l'accumulation de ces lipides aux "frontières" des différents compartiments intracellulaires sont étroitement dépendantes du caractère amphipathique de la molécule lipidique où "tête" et "queue" apolaire, hydrophobe et lipophile (acides gras, bases à longue chaîne) sont associées.

#### 2 - Glycosphingolipides et propriétés membranaires :

Intéressante dans la compréhension de l'établissement des structures et de l'architecture membranaires, l'amphipolarité des glycosphingolipides le sera également pour expliciter leur participation directe aux diverses activités qui sont reconnues aux membranes vivantes.

Il est bien établi actuellement qu'elles sont au centre de la plupart des grandsproblèmes physiologiques tels la perméabilité (notamment la perméabilité sélective vis-à-vis des ions minéraux et des petites molécules, le transport actif et le contrôle des échanges), la plasticité, l'extension, l'adhésivité de la surface cellulaire, la régulation ou la limitation de la croissance, la biosynthèse des parois, la génération et la conduction de l'influx nerveux, de l'information lors de l'irritabilité et de la reconnaissance.

Elles sont également impliquées dans de nombreuses conversions de l'énergie lumineuse en impulsions électriques (rétine) ou en énergie chimique (chloroplastes). Enfin, elles contribuent à diverses exocytoses et à établir les frontières des territoires où sont localisées les enzymes autolytiques. Ces dernières années, la participation des glycosphingolipides semble déterminante dans les propriétés des membranes animales et notamment dans les propriétés mécaniques telle la plasticité, ou plus physiologiques telles l'excitabilité et la conduction. Ils semblent contrôler les propriétés fondamentales de perméabilité liée au transport actif des ions et par conséquent à sa sélectivité. La plasticité des membranes est illustrée par la formation de vésicules qui apparaîssent par exemple lors du gonflement réversible des globules rouges soumis à un choc osmotique; ou après l'insertion d'une microélectrode par la possibilité de mesurer une différence de potentiel sans qu'aucune perturbation, tel un court circuit, n'apparaîsse;ou,enfin, lors de la libération par ultrasons des sous-unités lipoprotéiques des membranes mitochondriales (GREEN et coll., 1967).

Dans tous ces exemples, la vésicularisation est responsable de la cicatrisation, elle est rendue possible sans nul doute par la présence des protéines membranaires mais aussi grâce aux propriétés lubrifiantes des lipides de ces membranes. Actuellement, des expériences d'électrophysiologie appliquées à l'axoplasme du nerf de Crabe impliquent expressément dans ce processus de réponse à l'excitabilité, les glycosphingolipides membranaires.

#### - INCOMPATIBILITE DE FECONDATION -

Les mécanismes physiologiques qui se produisent entre la pollinisation à la surface du stigmate et la fécondation de l'ovule, reposent sur la reconnaissance du pollen par un stigmate ou un style, et sur des échanges de substrats assurant la germination et la croissance d'un tube pollinique qui amènera les gamètes au sac embryonnaire. Ces processus de reconnaissance, d'échange et de métabolisme actif sont soumis à des mécanismes rigoureux de contrôle génétique strictement définis pour chacum des partenaires et chez toutes les espèces.

Le style nous a paru représenter un excellent matériel pour analyser les rapports entre glycosphingolipides totaux et glycosphingolipides neutres et ces processus de reconnaissance, d'échange et de métabolisme actif.

Un mécanisme d'incompatibilité de fécondation est en effet connu qui se traduit par l'inhibition dans le style du tube pollinique formé, c'està-dire par l'autostérilité de l'individu bien que les deux partenaires soient physiologiquement normaux.

Une meilleure connaissance des mécanismes qui régissent l'autoincompatibilité a été très diversement envisagée, car les démarches expérimentales proposées reflètent les différents courants de pensée de ce siècle :

- applications de techniques histologiques aux différentes barrières à la fertilité reconnues ;

- applications de méthodes de fractionnement et d'identification aux différents aspects du métabolisme après pollinisation compatible et incompatible ;

- analyse des relations possibles entre surfaces polliniques et stylaires afin de mieux comprendre les modalités de leur reconnaissance et de leur refus ;

- analyse également, des structures membranaires afin de mieux comprendre quelques-unes de leurs activités en particulier dans l'effet des modifications de la perméabilité dès le signal de reconnaissance ou dans la qualité du transfert de ce signal.

Ce sont ces différents aspects de la recherche appliquée à une meilleure compréhension du processus de l'autoincompatibilité de fécondation que nous allons résumer ci-après.

#### I - DEFINITION DES BARRIERES DE FECONDATION

L'incompatibilité de fécondation est très répandue chez plus de 3000 espèces végétales appartenant à 350 genres distribuées dans environ 70 familles (GAGNIEU, 1950 ; BREWBAKER, 1957 ; LINSKENS et KROH, 1967).

Jusqu'à ces dernières années, toutes tentatives d'une meilleure compréhension de l'incompatibilité de fécondation ont reposé sur l'analyse des relations de l'inhibition de la croissance du tube pollinique en fonction de son déterminisme génétique et d'un métabolisme actif nouveau par de multiples déviations glucidiques, protéigues et lipidiques. Ces tentatives ont conduit

#### LOCALISATION DES BARRIERES D'INCOMPATIBILITE



- 1 : inhibition de la germination du grain de pollen
- 2 : inhibition de la croissance du tube pollinique
- 3 : prévention de la fusion des gamètes



à distinguer des barrières à la fertilité selon les sites d'inhibition (figure 1) au niveau du stigmate, du style et de l'embryon.

#### 1 - Localisation au niveau du stigmate :

Au niveau du stigmate, la germination du pollen peut être plus ou moins totalement inhibée. Les rares tubes polliniques formés sont courts et recroquevillés, ils ne pénètrent pas dans la papille stigmatique et l'orientation de leur croissance est anormale dans son tropisme. Finalement, la formation d'un dépôt de callose marque le terme ultime de cette ébauche de germination. Ce processus est très largement distribué chez les Crucifères (CORRENS, 1913; RILEY, 1936; STOUT, 1922; BATEMAN, 1955).

La destruction du stigmate ou de sa surface par décapitation, irradiation aux rayons X ou solubilisation des lipides de surface par des solvants organiques lève l'inhibition, montrant ainsi que le site de la réaction incompatible est bien le stigmate.

#### 2 - Localisation au niveau du style :

Le tube pollinique formé par germination du pollen sur un stigmate pénètre dans le style, mais sa croissance primitivement ralentie sera finalement bloquée à une certaine distance ou hauteur du stigmate dans le style. Ses parois sont épaissies et un bouchon de callose obstrue également sa partie apicale.

Etudié chez Veronica (FILZER, 1926) et Nicotiana (EAST et MANGELSDORF, 1925) ce cas d'incompatibilité correspond au type personé parce qu'il est très répandu chez les Personées qui comprennent également Petunia. Mais ce cas d'incompatibilité apparaît également dans des groupes plus éloignés tels que les genres Prunus ou Oenothera (LINDER, 1957).

#### 3 - Localisation au niveau de l'embryon :

Les tubes polliniques atteignent le sac embryonnaire et la syngamie est effective mais les embryons dégénèrent. Observé par SEARS (1937) ce cas correspond davantage à une inhibition de combinaison gamétique probablement sous l'influence des téguments (LINSKENS, 1966).

#### II - DETERMINISME GENETIQUE

Depuis les travaux de DARWIN (1876), CORRENS (1913), EAST et MANGELSDORF (1925), EAST (1915 - 1929), on sait que la réaction d'inhibition est dûe à la présence d'un gène S dont la transmission héréditaire s'effectue selon un mécanisme mendélien. Deux systèmes génétiques ont été identifiés : l'un à détermination gamétophytique (AIG), l'autre à détermination sporophytique (AIS).

#### 1 - Autoincompatibilité gamétophytique de fécondation :

Dans ce cas, c'est le génotype haploïde du pollen (gamétophyte issu de la méiose) qui détermine la compatibilité ou l'incompatibilité de fécondation. Bien représenté chez de nombreuses Personnées telle *Petunia*, il peut être compris en considérant l'exemple d'*Oenothera missouriensis* (LINDER, 1967). Une plante à génotype  $S_1S_3$  par exemple donnera, après méiose, une population des microspores composée par moitié d'individus  $S_1$  et d'individus  $S_3$ . Leur comportement varie selon l'allèle S rencontré dans le style (cf. schéma de ségrégation méiotique). Le tube pollinique  $S_1$  ne peut traverser le style de la plante  $S_1S_2$  et féconder ses ovules. Par contre, le style  $S_1S_2$  ne refusera pas le passage du tube pollinique  $S_3$ .

04 04	s <sub>1</sub>	s <sub>3</sub>
s <sub>1</sub>	-	S <sub>1</sub> S <sub>3</sub>
s <sub>2</sub>	-	<sup>S</sup> 2 <sup>S</sup> 3

La descendance ne comporte ici que deux génotypes : le croisement est dit demi-compatible et le type d'incompatibilité est bien à détermination haploide. Ce contrôle se fait par un seul locus possédant plusieurs allèles. Ce type d'incompatibilité peut donc être défini comme gamétophytique monofactoriel. Il est rencontré chez les genres *Nicotiana, Petunia, Lycopersicum, Solanum, Prunus* et *Trifolium*. Un système gamétophytique bifactoriel a été découvert chez les Graminées (LUNDQUIST, 1955). Dans ce cas, deux loci (S et Z) indépendants sont polyalléliques et le pollen est rejeté quand les allèles aux deux loci sont également présents dans le stigmate et dans le style; il ne l'est pas dans les autres cas.

D'autres systèmes bifactoriels ont été étendus à d'autres familles par DE NETTANCOURT (1972), PANDEY (1957) et LUNDQUIST (1962). Ils seraient également répandus chez les Angiospermes et en particulier chez les Dicotylédones (LUNDQUIST, 1975).

#### 2 - Autoincompatibilité sporophytique de fécondation :

Le second cas d'incompatibilité est dit sporophytique, car c'est le génotype du sporophyte qui s'inscrit globalement dans le cytoplasme et la paroi de toute la population des microspores, indépendamment du génotype haploïde de chaque grain de pollen. Le contrôle sporophytique du comportement du pollen dans ce système d'autoincompatibilité a été analysé par CORRENS (1913) chez les Crucifères. L'étude génétique de ce contrôle a été poursuivie par BATEMAN (1954 - 1955). Un système analogue a été décrit pour les Composées par HUGHES et BABCOCK (1950).

Un seul locus possédant des séries alléliques est en cause. Le système sporophytique est monofactoriel, mais il peut être homomorphe ou hétéromorphe (DE NETTANCOURT, 1972). Le système AIS homomorphique est plus simple que le système AIS hétéromorphe (qui repose sur des différences structurales florales), bien que des relations de dominance et d'indépendance entre les divers allèles au moment de la détermination des phénotypes du pollen et du style soient connues (SAMPSON, 1957 ; THOMPSON, 1957 ; DE NETTANCOURT, 1972).

## TABLEAU 1

# CONTROLE GENETIQUE DE L'AUTOINCOMPATIBILITE

	Con	Nombre de	Nambre		
Morphologie	Pollen Stigmate-Style		loci	d'allèles	
Homomorphique	<u>sporophytique</u> : dépend des gènes, relation de do- minance.	comme pour le pollen	1	plusieurs	
	<u>gamétophytique</u> : action des gènes dans chaque grain haploïde	action des gènes dans chaque cel- lule haploïde	1 à 2	plusieurs	
Hétéromorphique	<u>sporophytique</u> : avec dominance	dominance	1	2	

LIL

Le tableau 1 (LEWIS, 1954) et la figure 2 (DE NETTANCOURT, 1972) résument les diverses situations génétiques publiées par des revues récentes (ARASU, 1968 ; TOWNSEND, 1971 et DE NETTANCOURT, 1972).

#### III - PHYSIOLOGIE DE L'INCOMPATIBILITE

De nombreuses hypothèses ont été avancées pour tenter de fournir une interprétation moléculaire aux barrières d'incompatibilité de fécondation en retenant que cette réaction est toujours caractérisée par sa haute spécificité.

#### 1 - Relations avec la respiration :

Les études expérimentales ont porté essentiellement sur les autoincompatibilités de surface (Crucifères) ou d'inhibition de croissance du tube pollinique (*Petunia*, *Oenothera* et *Lilium*). D'une manière générale, la pollinisation exige un apport énergétique des tissus stylaires mais cette exigence sera beaucoup plus impérieuse en incompatibilité. Le processus respiratoire est perturbé, ce que montre la forte consommation en oxygène des auto-tubes où, entre 3 et 8 heures de pollinisation, les valeurs des tensions en oxygène sont environ 20 % plus élevées. Cet accroissement repose sur l'augmentation des activités des enzymes impliquées dans la respiration (phosphatase acide et cytochrome oxydase), sur la dégradation des substrats glucidiques, protéiques et enfin sur une participation plus active des lipides dont l'augmentation du taux de désaturation doitêtre lié à ce processus (CARON, 1972).

Il faut, avec STANLEY et LINSKENS (1967), souligner l'importance du gradient de pression en oxygène qui va décroissant du stigmate vers l'ovule, or l'éclatement des tubes polliniques est lié à l'apparition de faibles tensions en oxygène. Ainsi, toutes variations de ces tensions interviendraient dans le contrôle du développement de l'autostérilité.







#### FIGURE 2

#### 2 - Relations avec le métabolisme des hydrates de carbone :

En ce qui concerne le bilan des hydrates de carbone, les observations montrent que les tubes incompatibles possèdent par rapport aux xéno-tubes, un plus grand nombre de bouchons de callose ainsi qu'une trame plus dense de fibrilles cellulosiques dans la paroi de l'extrémité du tube. Ces dépôts de glucides sont utilisés pour la croissance normale du xéno-tube.

Lors de la croissance du tube pollinique, les hydrates de carbone affluent dans le style en même temps que baisse le taux de sucre libre. Il y a accumulation d'amides, telles l'asparagine et la glutamine (LINSKENS, 1967). Ce processus plus rapide dans les styles xénopollinisés que dans les styles autopollinisés permet de conclure à une dégradation et à une consommation plus intenses des protéines par les phénomènes respiratoires. C'est aussi ce qu'indique, après autopollinisation, l'apparition d'une forte reconversion de proline et glutamine, cette dernière étant incorporée aux processus respiratoires (LINDER-LINSKENS, 1972 ; LINDER-COUSTAUT, 1966).

Bien que des relations existent entre la réaction d'inhibition de croissance du tube pollinique (expression de l'autoincompatibilité) et sa nutrition, ce sont les études du métabolisme protéique lié à la pollinisation compatible ou incompatible qui ont été prépondérantes jusqu'en 1973 environ.

#### 3 - Relations avec le métabolisme protéique :

Il a été montré que le tube pollinique et les cellules du tissu conducteur sont le siège d'intenses réactions métaboliques nées de leurs échanges. Le tube pollinique émet des hormones et des enzymes ; ces dernières sont destinées à se frayer un chemin et à assurer sa nutrition et l'élaboration de sa paroi. De son côté, le style fournira l'eau, les substrats et également les enzymes.

Ces intéractions métaboliques bien étudiées en pollinisation compatible, conduisent à des modifications des activités enzymatiques locales où des inhibitions temporaires (phosphatases alcalines) sont notées parallèlement à l'activation d'autres systèmes enzymatiques (ROGGEN, 1967). C'est ainsi que chez *Petunia* si la xénopollinisation est caractérisée par l'augmentation des

 $\alpha$ -mannosidases (multipliée par 5), de la N-acétyl- $\beta$ -glucosaminidase (doublée), l'autopollinisation par contre ne modifie pas l'activité de la N-acétyl- $\beta$ -glucosaminidase et de l' $\alpha$ -mannosidase, mais double celle de l' $\alpha$ -galactosidase du style (LINSKENS et coll., 1969). Il est vraisemblable que ces rapports simples qui sont obtenus (2 pour la N-acétyl- $\beta$ -glucosaminidase, 5 pour l' $\alpha$ -mannosidase) supposent l'induction d'une synthèse spécifique conduisant à des polymères hybrides (isozymes).

La croissance d'un tube pollinique semble dépendre de la formation d'isozymes bien adaptées à la synthèse de la paroi des tubes. Mais l'induction d'isozymes repose sur la présence de sites complémentaires dans les structures moléculaires de telle sorte que l'absence de sites conduit à l'impossibilité de synthétiser des monomères spécifiques des deux allèles identiques, ce qui explique la non augmentation des activités enzymatiques observée.

Dans l'incompatibilité ce ne sont pas tellement les relations inhibition nutrition qui semblent les plus importantes, bien que les alternances lumière obscurité influencent la capacité photosynthétisante des styles de *Petunia* et par voie de conséquence la réaction d'inhibition d'un tube pollinique. On sait en effet, que ses réserves nutritives sont faibles et la demande en substrat élevée tant pour sa croissance que pour le processus respiratoire lié à sa croissance.

Il apparaît surtout que l'incompatibilité de fécondation est dominée par la spécificité génétique d'induction d'une synthèse protéique dans le tissu récepteur, sous l'influence d'une molécule spécifique introduite au cours de la gamétogénèse. Mais il a été constaté que la pollinisation fait largement appel à des échanges d'eau, de substrats et que les activités enzymatiques nécessaires à la croissance du tube pollinique sont sous l'étroite dépendance de l'équilibre des concentrations ioniques dans le milieu stylaire.

Il est ainsi devenu de plus en plus évident que l'incompatibilité de fécondation évoque, dans une large mesure, l'absence d'un facteur de perméabilité des membranes que le pollen ne peut trouver que sur un stigmate porteur d'un autre allèle.

#### 4 - Relations avec le métabolisme lipidique :

Les relations entre troubles de la perméabilité et perturbations des échanges de substrats et d'activités enzymatiques d'une part, entre perméabilité et signal de reconnaissance, réception et transfert de l'information d'autre part, ont conduit à des analyses préliminaires des lipides. Ces analyses concernent le métabolisme des lipides totaux, les études des lipides participant aux structures membranaires, leurs inter-relations dans les membranes, ou avec d'autres molécules constitutives telles les glycoprotéines ou les polysaccharides impliqués dans la structure des parois ou des membranes, ou encore avec les sécrétions des surfaces de contact pollen - stigmate. Aussi, différentes méthodes d'analyses biochimiques, de cytologie, de cytochimie et d'électro-physiologie participent-elles à ce renouveau des recherches.

Rappelons, avant d'envisager les relations de surface pollen - stigmate, les quelques acquisitions apportées par l'étude de la participation des lipides à l'inhibition de croissance et au métabolisme spécifique de l'incompatibilité de fécondation.

La participation des lipides dans la réaction d'incompatibilité a été envisagée bien que nos connaissances sur les lipides des plantes soient peu avancées. STOWE (1960) avait montré que la croissance des sections de Pois était facilitée par la présence d'esters méthyliques d'acides gras à longue chaîne (linoléate de méthyle) sans doute en synergie avec l'auxine si la concentration en esters est faible. Par contre, une activité inhibitrice de la croissance des bourgeons axillaires des plants de Tabac par certains acides gras, a été caractérisée par TSO (1964).

Le pollen d'*Oenothera missouriensis* renferme deux esters méthyliques naturels (COUSTAUT-LINDER, 1977) : oléate et arachidonate de méthyle. Cette composition a été rapprochée de celle du pollen de blé où coexistent caproate et caprylate de méthyle (CONNELL, 1964) et surtout du pollen de mais bien que les concentrations soient ici plus faibles (FATHIPOUR, 1967). L'acide caprique (C10 : 0), inhibiteur de croissance, est caractérisé strictement dans le pollen en relation avec l'allèle  $S_1$ . Mais ces recherches sont surtout intéressantes au niveau des phospholipides par leur distribution qui est spécifique de la nature pollinique riche en phosphatidylinositols, ou stylaire qui renferme essentiellement des phosphatidylglycérols. Cependant, cette fraction lipidique est très hétérogène ; le pollen est plus riche que le style en phospholipides et la pollinisation est illustrée par une nette diminution des phospholipides (CARON, 1972).

# IV - CONCEPTIONS ACTUELLES CONCERNANT LES RELATIONS POLLEN - STIGMATE - STYLE

La réaction d'incompatibilité est une réaction qui résulte de la reconnaissance d'un pollen, dès son dépôt, sur un stigmate et du refus de ce pollen par le style si tous deux renferment le gène S d'incompatibilité. Ces relations sont admises depuis longtemps et plusieurs hypothèses ont été avancées afin d'en comprendre le mécanisme.

Les unes reposent sur des analogies avec les phénomènes de l'immunité (SAMPSON, 1962 ; LEWIS, 1960 ; LINSKENS, 1965 ; BURNET, 1971), ou sur des systèmes inducteurs-répresseurs tels qu'ils ont été identifiés chez les microorganismes (LEWIS, 1965 ; ASCHER, 1966 ; LINSKENS, 1974 ; PANDEY, 1975). Mais toutes ces hypothèses possèdent en commun l'éventuelle synthèse, induite par le gène S, d'une molécule spécifique dans le style incompatible et dans le pollen. L'interaction entre ces molécules serait responsable des réactions de reconnaissance et ultérieurement de celles du rejet. Aucune précision n'est apportée concernant, lors de la réaction de reconnaissance, l'identité de ces molécules ou leur complémentarité structurale. De même, ces hypothèses conduisent à une grande variabilité des origines moléculaires d'une réaction de rejet qui reposerait sur l'induction de systèmes inhibiteurs (LEWIS, 1965), sur une répression des systèmes de croissance (LEWIS, 1965 ; ASCHER, 1966 ; PANDEY, 1975) ou sur une dérépression des systèmes inhibiteurs (LINSKENS, 1974).

D'autres hypothèses, enfin, s'appuient sur la déficience d'un système enzymatique. Elles sont issues de la Verbrauchs-théorie formulée par STRAUB (1947) ; un gène S induirait quantitativement la biosynthèse d'une molécule qui sera ultérieurement inactivée par un système dont la synthèse est également induite par le même gène S dans un style incompatible.

Pour KROES (1973), les pollens de génotype S ne diffèrent que par l'absence ou la déficience d'une molécule ; par exemple, la présence d'un allèle S spécifique dans un pollen se concrétisera par l'absence d'une enzyme indispensable à sa croissance ou à sa nutrition. Dans un style, la présence d'un allèle S se traduira par la formation d'un complexe spécifique dans lequel une molécule (monosaccharide ou élément inorganique tel le bore) nécessaire à la croissance pollinique, est liée à une protéine. Ainsi, chaque tube pollinique est supposé être capable de synthétiser toutes les enzymes nécessaires à la destruction du complexe stylaire, exception faite d'une seule enzyme correspondant à l'allèle S qu'il porte.

Ainsi, des nombreuses hypothèses présentées ici, aucune ne satisfait pleinement. Leur multiplicité même atteste de l'insuffisance de chacune d'elle. Si un accord unanime semble être réalisé quant à la structure tripartite du locus S proposé par LEWIS (1965), elles apparaîssent très éloignées les unes des autres dans les modalités de la reconnaissance, le moment où s'effectue la synthèse des molécules permettant la reconnaissance, leurs sites respectifs et surtout, aucune précision ne conduit à une meilleure connaissance des bases moléculaires du transfert de l'information à partir du site de reconnaissance vers les sites de rejet (stigmates et styles).

L'incompatibilité de fécondation semble dépendre largement d'effets de surface entre pollen et stigmate. L'inhibition de la germination ou de la croissance du tube pollinique, porteur de l'allèle S d'incompatibilité, doit être en relation avec une information née de la reconnaissance du pollen dès son dépôt sur un stigmate, et de la transmission de cette information dans le style et stigmate étant également porteurs du même allèle S.

Les recherches dans ce domaine concernent essentiellement l'élucidation d'un fait acquis : la présence d'un gène S d'incompatibilité dans le pollen et les styles. L'autoincompatibilité de fécondation fait largement penser à une réaction entre plusieurs surfaces actives- celle du pollen qui va s'opposer aux surfaces du pistil- qui s'achèverait par un processus d'autorejet qu'illustre la formation de callose. En effet, l'incompatibilité n'est pas dûe à une incapacité des gamètes mais est issue des interactions (HESLOP-HARRISON, 1975) qui se déroulent à divers niveaux entre le gamétophyte mâle et le sporophyte femelle qui porte le gamétophyte femelle.

#### FIGURE 3

## INTERACTIONS GAMETOPHYTE - SPOROPHYTE DURANT LE PROCESSUS

#### DE FECONDATION

Phase	Destin du gamétophyte mâle	Intéraction avec les tis- sus sporophytiques	
Phase I : Pollinisation			
Phase II : Progamique	<pre>n° 1 : capture n° 2 : hydratation n° 3 : germination n° 4 : pénétration du tube pollinique n° 5 : croissance du tube pollinique dans le style</pre>	<pre>avec le matériel de la surface stigmatique avec la surface stigma- tique et les papilles sous-jacentes avec le tissu conducteur du style</pre>	
Phase III : Syngamique	n° 6 : pénétration dans le gamétophyte fe- melle et fusion	aucune : les intéractions se font avec le gamétophy- te femelle	

(BUS)

Ainsi du côté femelle, le contrôle de l'incompatibilité dépend du sporophyte diploïde pour les premières phases puis du gamétophyte haploïde pour la dernière. Du côté mâle, le contrôle dépend du gamétophyte haploïde et par extension du parent dont il est issu, par l'intermédiaire des matériaux qu'il transporte. A partir du stade 5, il en est totalement responsable (figure 3).

Il est intéressant de comparer le rejet dans la réponse autoincompatible et le rejet immunologique. Ces deux phénomènes impliquent un stade de reconnaissance mais, contrairement aux systèmes immuns, la reconnaissance dans les systèmes autoincompatibles n'est pas conditionnée par une molécule étrangère, mais par une molécule constitutive dans le sens où les tissus de reconnaissance femelles sont programmés pour identifier et réagir contre une autre cellule du même individu portant le même génome (HESLOP-HARRISON, 1975).

#### V - SURFACE POLLINIQUE ET REACTION D'INCOMPATIBILITE

Il est évident, du moins dans les systèmes AIS, que la paroi pollinique a un rôle important à jouer dans l'installation de la réaction d'incompatibilité. Le grain de pollen mature, chez la plupart des Angiospermes, possède une double paroi : la paroi la plus interne est appelée intine et la partie la plus externe est appelée exine.

#### 1 - Rappel de l'architecture de la paroi pollinique :

L'exine est essentiellement composée de sporopollénine. C'est une substance mal définie chimiquement, de nature lipidique, considérée comme un polymère oxydé de caroténoïdes et d'esters de caroténoïdes (BROOKS et SHAW, 1971 ; SHAW, 1971 ; HESLOF-HARRISON, 1975), très résistante aux dégradations acides ou enzymatiques.

A maturité, l'exine d'aspect stratifié, est différenciée en une partie interne non sculptée (nexine) et une partie externe sculptée, la sexine (HESLOP-HARRISON, 1975). La sexine est un ensemble de colonnes radiales provenant de la nexine. L'architecture de ces colonnes ou bacules est identique en général chez les mono et dicotylédones. En l'absence de tectum (toît) les cavités délimitées par les bacules sont ouvertes à l'extérieur ; par contre, quand le tectum est formé, il est perforé et des micropores assurent les communications avec l'extérieur.

Par sa structure, l'exine semble donc bien adaptée à l'émission de produits d'importance capitale (HESLOP-HARRISON, 1975). C'est ainsi que les protéines de l'assise nourricière du tapis seront libérées lors de la dissociation de ce tissu et transférée dans l'exine. Le transfert des lipides, également synthétisés en grande quantité à la fin de la durée de vie accordée au tapis, sera ainsi assuré vers la surface du pollen. Certains caroténoïdes responsables de la couleur du pollen (HESLOP-HARRISON, 1968), accompagnent ces lipides en raison de leur liposolubilité. L'exine enfin, est remarquable par la faiblesse de ces activités enzymatiques (HESLOP-HARRISON et coll., 1973).

L'intine, ou couche interne de la microspore, est synthétisée par vagues successives parallèlement au développement de l'exine, par accumulation de matériel amorphe cellulosique. Chronologiquement, le développement de l'intine suit donc celui de la sporopollénine. Par sa nature, elle est essentiellement pecto-cellulosique bien qu'une incorporation de protéines ait été démontrée (KNOX, 1971 ; KNOX et HESLOP-HARRISON, 1970). Les enzymes, notamment les hydrolases acides, ne représentent qu'un faible pourcentage des protéines de l'intine.

Il n'était pas inutile de rappeler ici les principaux traits de l'architecture de la paroi et les modalités de l'incorporation des constituants dans les enveloppes polliniques pour plusieurs raisons. D'une part, parce que les différentes macromolécules (glucides, lipides et protéines) déposées successivement, n'ont pas la même origine ; les unes dérivent du gamétophyte haploïde, les autres du sporophyte parental diploïde. D'autre part, par les nombreuses cavités délimitées par les bacules, les parois ont une structure adaptée à l'accumulation de ces molécules puis à leur libération quelle qu'en soit leur origine.

## TABLEAU 2

DETECTION DES EMISSIONS PROTEIQUES DES SITES DE L'EXINE ET DE L'INTINE DANS DES GRAINS DE POLLEN DE DIFFERENTS TYPES STRUCTURAUX.

Espèces et types de pollen	Vitesses d'émission des fractions protéiques sporophytiques de la sexine	Vitesses d'émission des fractions protéiques gamétophytiques des sites de l'intine	
Alopecturus pratensis Dactylis glomerata			
Graminées, 1 seule ouvertu- re de germination. Exine lisse	< 25 sec.	2 - 3 min.	
Silene vulgaris			
Caryophyllacées, plusieurs ouvertures. Exine plus ou moins lisse	< 30 sec.	1 - 5 min.	
Cosmos bipinnatus			
Composées, 3 fentes	2 - 5 sec.	10 - 20 min.	
Ambrosia trifida			
Composées, 3 fentes	2 - 5 sec.	30 sec.	
Iberis sempervirens			
Crucifères, 3 fentes	< 20 sec.	6 - 10 min.	
Hibiscus rosa-sinensis			
Malvacées, plusieurs ou- vertures non operculées. Exine plus ou moins lisse	< 30 sec.	4 - 5 min.	

#### 2 - Dépôt et émission des protéines du pollen :

Au cours de sa maturation, le grain de pollen se déshydrate progressivement et ne renferme finalement que 15 % d'eau. Une substance de nature lipidique recouvre souvent sa surface (HESLOP-HARRISON, 1968 ; HESLOP-HARRISON et coll., 1973). Sa germination implique un processus de réhydratation qui débutera dès son dépôt sur la papille stigmatique. Il s'en suit une courte période de reconnaissance déterminante pour la germination, la formation du tube pollinique, sa pénétration dans le stigmate, sa croissance dans le style et enfin la libération des gamètes.

Le mécanisme qui préside à l'émission d'une ébauche de tube pollinique dépend d'un équilibre hydrodynamique (HESLOP-HARRISON, 1972). Les pores germinatifs à opercule possèdent par exemple un système de "feed back" positif. En effet, à l'état déshydraté, les pores sont fermés par un bouchon de sporopollenine qui sera ultérieurement propulsé vers l'extérieur lors de la réhydratation du pollen déposé sur la surface du stigmate.

L'hydratation des grains de pollen s'accompagne de la libération de fractions protéiques (STANLEY-LINSKENS, 1965 ; MAKINEN-BREWBAKER, 1967). Ces émissions protéiques proviennent de la paroi du grain de pollen, et non de la cellule végétative elle-même ; elles sont retrouvées sans aucune exception dans toutes les espèces étudiées.

Par différentes techniques d'identification et de localisation, deux types d'exsudats sont distingués : exsudats à court terme et exsudats à long terme. En 1965, STANLEY et LINSKENS avaient remarqué que la diffusion des protéines s'effectuait avec une certaine vitesse, très rapide au début de l'hydratation, la diffusion se prolonge selon des vitesses décroissantes pendant au moins 30 minutes. Le volume final de l'exsudat pollinique correspond à environ 5000 µg de protéines, ce qui implique une reprise de la vitesse de diffusion. L'existence de deux types d'exsudats en fonction de leurs vitesses respectives a été confirmée par la technique des empreintes polliniques (pollen prints) associée à la coloration protéique par le bleu de coomassie. Ces deux types d'exsudats sont indépendants de l'espèce et du type de pollen considérés (tableau 2) et leurs vitesses diffèrent en fonction de leurs origines.



#### TABLEAU 3

## LOCALISATION DES EMISSIONS PROTEIQUES DANS LES GRAINS DE POLLEN DE TYPE

Pas d'ouverture	Un seul pore	Nombreux pores	Une seule fente	3 fentes
Crocus vernus	Zea mays	<i>Malvaviscus</i> Malvacées	<i>Lilium</i> Monocotylédones	<i>Cosmos</i> Dicotylédones
Partie centrale de l'intine Uniforme sur toute la surface du grain de pollen	L'intine au niveau du pore Mais il existe une fine zone d'activité dans l'intine ailleurs qu'au niveau du pore	Intine au niveau de chaque pore et en par- ticulier au niveau de la cellulose diffuse du pore Il existe une fine zone d'activité dans l'intine interporale	Intine du colpus La plus grande partie de l'activité est si- tuée au niveau des bords du colpus dans le grain distendu	Couche externe de l'in- tine au niveau de cha- que colpus et plus par- ticulièrement sur les bords de ces colpus dans les grains disten- dus Il existe une faible activité au niveau de l'intine mésocolpiale

STRUCTURAL DIFFERENT (KNOX ET COLL., 1969)

Ainsi, l'exsudat dit à court terme correspond à la diffusion rapide de protéines (1 à 30 secondes) contenues dans les cavités de l'exine et qui sont d'origine sporophytique. Par contre, l'exsudat à long terme correspondra à des protéines caractérisées par la lenteur de leurs vitesses de diffusion. Emises par les sites de l'intine, ces protéines sont d'origine gamétophytique.

#### 3 - Localisation et identification des protéines émises :

L'identification des deux types de fractions protéiques différentes par leur origine et leur localisation, n'a été réalisée que chez les pollens des plantes à autoincompatibilité sporophytique.

a) <u>protéines de l'intine</u>. L'étude de ces protéines de l'intine a été facilitée par la faiblesse de leur vitesse de diffusion et par l'association des techniques cytochimiques et d'immunofluorescence (KNOX et coll., 1969 -1972). Ainsi il a été possible non seulement de déterminer leur localisation, mais simultanément de montrer que ces localisationscoïncident avec les sites des activités enzymatiques qui sont précisées par des méthodes cytochimiques en microscopie optique. La localisation des protéines de l'intine ainsi définies par KNOX et coll. (1969), en fonction des espèces et du type de pollen, est reportée tableau 3 . Ces protéines sont toujours concentrées au niveau des orifices de germination. En l'absence d'ouvertures bien définies, l'émission protéique est uniformément répartie sur toute la surface. La lenteur de l'émission protéique peut dès lors se comprendre en fonction de cette fixation sur l'exine par l'absolue nécessité d'une réhydratation totale de l'intine, avant que ne commence leur diffusion.

La nature enzymatique de ces protéines de l'intine a été montrée pour la première fois par TSINGER (1961). Par la suite, KNOX (1969 - 1970 - 1971) le confirmera en identifiant une classe d'enzymes hydrolytiques strictement localisées dans la couche interne de la paroi, dans plus de 60 espèces. Mais la richesse enzymatique du pollen serait encore plus importante et selon EREWBAKER (1971), plus de 40 enzymes différentes par leurs activités spécifiques sont identifiées. Cependant, paradoxalement à cette large distribution

#### TABLEAU 4

## REPARTITION DES ENZYMES DANS LES DIVERS SITES DE LA PAROI

### POLLINIQUE

	Localisation			
Protéines	intine	exine	Auteurs	
<b>dé</b> shydrogénases	-	+	TSINGER et coll., 1961 BREDEMEIGER, 1970 - KNOX, 1971 DAVIES, 1972.	
cytochrome oxydase péroxydase	-	+ -	TSINGER et coll., 1961 LEWIS et coll., 1967 PANDEY, 1967 - 1972 BREDEMEIGER, 1973 - 1975	
phosphorylase ribonucléase	+ rapidemen sible	- nt diffu-	MARTIN, 1968 - HOPPER, 1972 KNOX et coll., 1969 - 1970 DICKINSON et coll., 1971	
phosphatase acide	+	-	HOWLETT et coll., 1975 STANLEY et coll., 1965 MAKINEN et coll., 1967 KNOX et coll., 1970 - 1971	
amylase	<b>+</b> .	+	KNOX et coll., 1970 - 1971 MAKINEN et coll., 1967	
β-1,4-glucanase	rapideme sible	nt diffu-	STANLEY et coll., 1965 LINSKENS et coll., 1969 - 1970	
estérase	+ .	+	KNOX et coll., 1969 - 1970 HOWLETT et coll., 1975 AHOKAS, 1976	
β-fructo-furanosidase	externe malemme	au plas-	LEWIS et coll., 1967 STANLEY et coll., 1965	
polygalacturonase (pectinase)	rapideme sible	nt diffu-	KONAR et coll., 1969 ROGGEN et coll., 1969	
protéinase (LAP)	+	+	KNOX et coll., 1970 - 1971 MAKINEN et coll., 1967	
allergènes (E,K)	÷	+	HOWLETT et coll., 1973 - 1975 KNOX et coll., 1970 - 1971	

leur réelle appartenance à la paroi n'a été que rarement prouvée (KNOX et coll., 1975). Dans le tableau 4 sont consignées les localisations respectives des transférases, UDP-glucose-phosphorylases, ribonucléase et hydrolases telles les phosphatases acides, les estérases, etc...

Les enzymes de l'intine peuvent être détectées à des stades différents de l'évolution pollinique et en particulier, au cours de la période qui suit la séparation des tétrades méiotiques (KNOX, 1975). Le ruban de protéines est inséré dans des lamelles cellulosiques au fur et à mesure que la paroi s'épaissit (KNOX, 1970). Les enzymes sont donc synthétisées par la cellule haploïde et leur origine est bien gamétophytique. La présence d'une protéine à activité antigénique identique à celle des IgE a été également démontrée au niveau de l'intine (HOWLETT et coll., 1973 ; KNOX, 1971 ; HOWLETT et coll., 1975). L'antigène serait présent sous deux formes immunologiquement similaires mais différentes par leurs points isoélectriques.

b) <u>les protéines de l'exine</u>. D'autres protéines sont contenues dans les cavités de la couche externe de la sexine où, quelle que soit leur architecture, la présence des bacules lui confère son aspect réticulé.

Les matériaux nutritifs du tapetum s'accumulent dans ces cavités pendant la phase finale de la maturation pollinique (HESLOP-HARRISON, 1968 - 1973) selon des volumes très variables. Ces protéines de l'exine sont donc d'origine sporophytique. Leur localisation et leur caractérisation ont exigé l'utilisation d'antisérums dirigés contre les diffusats rapides couplée à l'immunofluorescence afin de pallier à la rapidité de leur diffusion après humidification (HESLOP-HARRISON et coll., 1975).

L'application de ces techniques a permis à KNOX (1975) de préciser la localisation de ces protéines à vitesse de diffusion rapide, au niveau des cavités de l'exine, entre la nexine et la sexine et plus faiblement au niveau de l'intine.

Par des techniques de diffusion, différentes activités enzymatiques sont localisées : amylases et protéases (KNOX, 1972), déshydrogénases (KNOX, 1971) et oxydases (TSINGER, 1961 ; LEWIS et coll., 1967). Des hydrolases (tableau 4) sont également présentes dans l'exine et dans l'intine ainsi que des allergènes acides et basiques. KNOX (1975) a mis en évidence 6 à 7 fractions protéiques par électrofocalisation en gel de polyacrylamide, en présence de sodium-dodécylsulfate. Ces protéines sont définies par l'établissement de leurs points isoélectriques (pKi compris entre pH 5 et 7) et par celui de leurs poids moléculaires qui varient de 10 000 à 45 000 daltons.

Actuellement, les informations apportées par différentes méthodes histochimiques et biochimiques sont suffisamment denses pour permettre la comparaison des différentes fractions protéiques émises. Ainsi, l'examen des résultats d'études cytochimiques montre que les protéines stockées dans les deux sites de la paroi, quelle que soit l'origine de leur synthèse gamétophytique ou sporophytique, vont différer par leur localisation. En effet, les déshydrogénases et oxydases appartiennent à l'exine, cependant que les phosphatases (acides ou alcalines), les phosphorylases et les ribonucléases appartiendront à l'intine.

Cependant, l'hypothèse de l'hétérogénéité de certaines protéines a été émise. Elle a été vérifiée par l'identification des isohydrolases et des isoestérases. Ainsi, a été avancée l'hypothèse de l'hétérogénéité des hydrolases, ces protéines sont en effet identifiées à la fois dans l'exine et l'intine. En ces deux sites, malgré des origines différentes, les activités spécifiques sont les mêmes ; il s'agit d'isoenzymes. BREWBAKER (1971) a analysé dans les pollens, anthères, styles et ovules d'une même plante, les caractères de la variation des isoestérases. Certaines sont communes aux 4 types de tissus, deux par contre sont spécifiques du pollen et deux autres de l'anthère. BREWBAKER suggère donc que les estérases provenant du tapis (exine) et celles du pollen (intine) sont distinctes. Des travaux identiques ont été entrepris sur les isoenzymes des leucine-aminopeptidases, des phosphatases (MAKINEN et coll., 1962) et des estérases (KNOX, 1975).

Plusieurs hypothèses sont suggérées concernant l'élucidation de leurs fonctions spécifiques. Il est évident que de nombreuses enzymes doivent favoriser la dégradation de la surface stigmatique par le pollen et faciliter son mode hétérotrophique de nutrition.

Ainsi, certaines enzymes telles les hydrolases acides, permettent probablement l'émergence et la nutrition du tube pollinique dès les premiers stades de la germination puis sa pénétration dans le style.

Cependant, dans les fractions émises les concentrations de ces protéines enzymatiques sont extrêmement faibles. Aussi KNOX (1971) leur attribue un rôle dans la réaction de reconnaissance d'où leur nom protéines ou substances de reconnaissance. Leur hétérogénéité permettrait également de les impliquer dans de multiples réponses lors des réactions interspécifiques (en favorisant la pollinisation) et intraspécifique (en la refusant). Néanmoins, les divers travaux de KNOX (1975) et de HESLOP-HARRISON et coll. (1975) ne corroborent pas cette hypothèse.

#### VI - SURFACE STIGMATIQUE ET REACTION D'INCOMPATIBILITE

De récents travaux sont connus qui s'intéressent à la surface stigmatique des plantes à incompatibilité sporophytique et gamétophytique (DICKINSON-LAWSON, 1975; KONAR-LINSKENS, 1966).

En l'absence d'une classification physiologique des stigmates, leur distribution dans deux groupes est envisagée en considérant la nature des sécrétions qui recouvrent les papilles : des stigmates humides et secs sont ainsi reconnus.

#### 1 - Les stigmates humides :

Solanacées, Liliacées, Rosacées et Onagracées possèdent des papilles stigmatiques recouvertes d'une sécrétion abondante qui va s'accumuler et persister durant la vie du stigmate. Cet exsudat, généralement sous forme d'émulsion lipidique, sert à fixer, à induire puis à maintenir la germination du pollen.

Mais de nombreux travaux soulignent ici également une large hétérogénéité de composition des surfaces de ces stigmates où non seulement des constituants lipidiques mais aussi osidiques et protéiques sont identifiés. Chez *Petunia* par exemple, ce revêtement lipidique de la surface stigmatique ou cuticule liquide associe des acides gras (de 11 à 20 atomes de carbone) (MARTIN, 1968), des oses (KONAR, 1966), des composés phénoliques (MARTIN, 1968), des acides aminés libres et enfin des mucopolysaccharides responsables de la viscosité de cet exsudat.

#### FIGURE 4

EVOLUTION DU POTENTIEL ELECTRIQUE CHEZ PETUNIA HYBRIDA EN FONCTION DE LA POLLINISATION (LINSKENS-SPANGERS, 1973)



+ : autopollinisation

x : xénopollinisation



Ce revêtement est également caractérisé par la présence de protéines, quantitativement peu représentées chez *Petunia* (KROH, 1964) et chez *Lilium* (LABARCA et coll., 1970) où le taux de protéines est de 7 %. Cependant, l'application des techniques cytochimiques permet l'identification des activités spécifiques telles que celles des estérases (DICKINSON et coll., 1975).

#### 2 - Les stigmates secs :

Ils caractérisent essentiellement des plantes à incompatibilité sporophytique telles les Crucifères et les Composées. Mais en réalité, ils ne sont que théoriquement secs. Une pellicule protéique hydratée (MATTSON, 1974) sensible à la pronase et insensible aux lipases, recouvre les papilles stigmatiques. Cette pellicule recouvre à son tour une cuticule de cutine dont la discontinuité favorise les mouvements d'eau entre la couche pecto-cellulosique de la paroi et le milieu extérieur (MATTSON, 1974 ; HESLOP-HARRISON, 1975).

L'origine de ces protéines est précisée. Elles sont synthétisées dans le cytoplasme de la papille (HESLOP-HARRISON, 1975) puis diffusent à travers la couche pecto-cellulosique et s'étalent sur la surface externe. Par son origine, cette protéine peut donc être considérée comme une sécrétion sèche. Les méthodes d'électrophorèse en gel de polyacrylamide mettent en évidence une hétérogénéité protéique ou en particulier une activité estérasique,née au stade du bouton floral et qui augmente parallèlement à la maturation, va persister jusqu'à l'anthèse. Trois bandes distinctes d'estérases sont définies (HESLOP-HARRISON, 1975).

#### - CONCLUSION -

L'étude des surfaces cellulaires a été entreprises sous un aspect électrophysiologique par LINSKENS et SPANGERS (1973). Des potentiels d'action sont enregistrés après pollinisation entre la surface stigmatique et la base du style (figure 4 ). Après pollinisation (compatible et incompatible), une faible augmentation du potentiel est enregistrée qui devient négative par la suite. Son origine serait, d'après les valeurs présentées, ionogénique. Tous ces travaux reposent donc sur l'hypothèse d'un signal né de l'intéraction entre deux surfaces pollinique et stylaire. Sans pour autant considérer ces surfaces comme des structures passives (les acquisitions récentes dans le domaine de la biochimie des parois nous démentiraient), nous pensons que la réception d'un signal et son transfert doit reposer sur des structures bien plus actives et dynamiques par leur conformation , leur hétérogénéité structurale et par l'intimité de leurs relations avec les organelles intracellulaires (réticulum endoplasmique, appareil de Golgi et mitochondries).

C'est pourquoi nous avons entrepris, en étroite collaboration avec Monsieur le Professeur LINSKENS lié par un accord inter-universitaire au Laboratoire de Mademoiselle le Professeur COUSTAUT et avec Monsieur le Professeur LINDER qui dirige des recherches parallèles entreprises par Monsieur BRIS chez une autre espèce auto-incompatible (*Oenothera missouriensis*), l'étude des glycosphingolipides neutres des systèmes membranaires dans les pollens et les styles de *Petunia hybrida*.

Ainsi, après avoir défini les techniques d'extraction des lipides totaux, des glycosphingolipides neutres et des glycosphingolipides acides, leur fractionnement nous permettra une meilleure définition des constituants de ces glycosphingolipides.

Cette étude a été entreprise afin de mieux comparer la biochimie des pollens et celle des styles avant et après pollinisation. Elle l'a été dans l'espoir de nous conduire à une meilleure approche de l'expression moléculaire du "signal" lié à la constitution de la membrane biologique, à ses modifications en fonction de ses propriétés physiologiques où des altérations de la perméabilité et de l'activité enzymatique accompagnent la reconnaissance de l'allèle S.
# CHAPITRE I

.

- Généralités sur les glycosphingolipides	23
I - Composition et nomenclature	24
1 - Les céramides	24
2 - Les cérébrosides	24
3 – Les sulfatides	24
4 - Les gangliosides	25
II - Etude de la partie hydrophobe des glycosphingolipides : les céramides	25
1 – Les bases à longues chaînes	26
2 - Distribution des acides gras	30
3 - Métabolisme des céramides	32
III - Etude de la partie hydrophile des glycosphingolipides	32
1 – Les oligohexosylcéramides neutres	32
2 - Les sulfatides	36
3 - Les gangliosides	37
4 – Les phytoglycosphingolipides	38

# \_00\_00\_00\_00\_

# CHAPITRE II

-	Matériel	d'études		40
---	----------	----------	--	----

#### CHAPITRE

I

# - GENERALITES SUR LES GLYCOSPHINGOLIPIDES ETAT DE NOS CONNAISSANCES ACTUELLES.

On sait que les sphingolipides ou "cérébrosides" ainsi dénommés parce qu'ils furent découverts par THUDISCHUM dans les neurones cérébraux ont été également isolés dans d'autres cellules animales (spermatozoïdes, leucocytes, etc...).

Actuellement, les sphingolipides sont mieux connus et leur appartenance a été reconnue dans tous les organismes vivants : bactéries, végétaux et animaux. Ils représentent une classe de composés qui peuvent varier énormément.

La très grande multiplicité qu'offrent les glycosphingolipides résulte de la variabilité des trois constituants qu'ils ont en commun :

- la sphingosine ou base à longue chaîne (LCB) ;

- les acides gras (AG) ;

- les carbohydrates.

Certains glycosphingolipides très complexes contiennent, en plus, des résidus sulfuriques, et dans le règne végétal, également des résidus phosphoriques.

#### I - COMPOSITION ET NOMENCLATURE

1 - Les céramides :

Les sphingolipides représentent une classe de lipides complexes qui renferment dans leur structure une molécule de sphingosine (diol aminé à longue chaîne) liée à un acide gras par une liaison amide en position 2 donnant lieu à la formation de N-acyl-sphingosine ou "céramide".

Notons que ce terme de "céramide" est une appellation communément usitée dès que la nature de la base ou celle de l'acide gras n'est pas précisée.

On distingue plusieurs autres types de sphingolipides.

#### 2 - Les cérébrosides :

Leur structure est caractérisée par la présence d'une ou plusieurs molécules d'hexoses (ou d'hexosemines) unie(s) à la sphingosine du céramide par liaison osidique, ce qui conduit aux :

- monoglycosylcéramides (MGCer) : ce sont, le plus souvent, des céramides unis par liaison osidique à une molécule de glucose ou de galactose ;

- diglycosylcéramides (DGCer) : ce sont des céramides dérivés des précédents par fixation d'une seconde molécule d'hexose par une liaison osidique fréquemment de type 1-4 ;

- triglycosylcéramides (TGCer) et tétraglycosylcéramides (TRGCer) : ils renferment respectivement 3 et 4 résidus monosaccharidiques dans leur molécule.

#### 3 - Les sulfatides :

Ce sont des cérébrosides dont un résidu osidique est sulfaté (exemple : les esters sulfuriques du galactose (en position C3) ou galactocérébrosides).

Leurs acides gras possèdent fréquemment de longues chaînes carbonées (acide lignocérique, C:24 ; acide béhénique, C:22).

#### 4 - Les gangliosides :

Ce terme désigne des glycosphingolipides dont la molécule est caractérisée par la présence d'une ou plusieurs molécules d'acide sialique (acide neuranimique).

De grands progrès ont marqué ces dernières années la chimie des lipides. Cet enrichissement de nos connaissances est étroitement lié au développement des techniques de microanalyse , à leur large diffusion dans les laboratoires intéressés par le métabolisme des lipides. La généralisation des techniques de chromatographie d'adsorption, d'échange ionique, leur association avec d'autres techniques chromatographiques (sur couche mince et en phase gazeuse) et avec des méthodes physiques (spectrophotométrie dans l'ultra-violet, en infrarouge, spectrométrie de masse) ont aidé à l'étude des lipides en général et a montré l'hétérogénéité des glycosphingolipides qui sont des lipides complexes. Ceuxci sont, en particulier, caractériséspar la juxtaposition dans leur molécule d'une partie lipophile (acides gras et bases à longueschaînes) et d'une partie hydrophile (substituants osidiques).

#### II - ETUDE DE LA PARTIE HYDROPHOBE DES GLYCOSPHINGOLIPIDES : LES CERAMIDES

Les céramides représentent la fraction lipophile. Leur complexité structurale a été établie par l'application et la confrontation de nombreuses méthodes analytiques qui associent par exemple :

- la dégradation oxydative par l'acide périodique, la réduction par le borohydrure ou l'hydrolyse acide douce (KATES, 1972) permettent dans un premier temps la libération des céramides par hydrolyse de la copule osidique des glycosphingolipides ;

- l'utilisation de mélange hydrolytique, tel le méthanol-HCl qui libère les bases à longue chaîne et les acides gras des céramides et des glycosphingolipides (KATES, 1972 ; GAVER et SWEELEY, 1965 ; CARTER et GAVER, 1967) ;

- la chromatographie en phase gazeuse couplée ou non à la spectrométrie de masse (SAMUELSSON-SAMUELSSON, 1970 ; HAMARSTROM et coll., 1970). La séparation, l'identification et le dosage des bases et des acides gras seront ainsi réalisés.

Il existe un grand nombre de bases connues (60 environ) et d'acides gras (200 environ), (HIRVISALO-RENKONEN, 1970 ; MARTENSSON, 1969). Il en résulte une très grande variabilité dans la structure des céramides. La signification biologique de cette variabilité est encore mal définie.

# TABLEAU 5

# CLASSIFICATION DES PRINCIPALES BASES A LONGUE CHAINE

Bases dih	ydroxylées	Bases trihýdroxylées				
saturées	insaturées	saturées	insaturées			
d18 : 0	d18 : 1 <sup>4 trans</sup>	£18 : 0	t18 : 1 <sup>8</sup> trans			
Sphinganine	Sphingenine	4-D-Hydroxy- sphinganine	4-D-Hydroxy-8- sphingenine			
Dihydrosphingosine	Sphingosine	Phytosphingosine	Dehydro- phytosphingosine			
$CH_{2}OH$ $HC-NH_{2}$ HC-OH $CH_{2}$ $CH_{2}$ $CH_{2}$ $CH_{2}$ $(CH_{2})_{10}$ $CH_{3}$	CH <sub>2</sub> OH HC-NH <sub>2</sub> HC-OH HC CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>10</sub> CH <sub>3</sub>	$CH_{2}OH$ $HC-NH_{2}$ $HC-OH$ $HC-OH$ $CH_{2}$ $CH_{2}$ $CH_{2}$ $(CH_{2})_{10}$ $CH_{3}$	CH <sub>2</sub> OH HC-NH <sub>2</sub> HC-OH HC-OH (CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> HC CH (CH <sub>2</sub> ) <sub>8</sub> CH <sub>3</sub>			

BU

1 - Les bases à longues chaînes :

Jusqu'à ces dernières années, les bases à longue chaîne étaient restreintes à quelques espèces moléculaires (tableau 5), soit :

- la sphingosine
 - la dihydrosphingosine
 / rencontrées toutes deux dans les glycosphingolipides
 / des tissus animaux

- la phytosphingosine plus localisée dans le règne végétal.

Actuellement, 60 espèces de bases à longue chaîne ont été dénombrées (KARLSSON, 1971). La sphingomyéline du lait de vache ou de rein de boeuf en contient 30 environ (KARLSSON, 1968). Cependant, le nombre de bases isolées est en réalité plus faible puisque 17 au total le sont dont 5 sont communes aux organismes végétaux et animaux et une seule, la 4-D-hydroxy-8-sphinganine, est spécifique des plantes.

Les progrès de la chimie analytique et les méthodes nouvelles apportées par l'évolution et l'application des techniques physiques dans la chimie des lipides sont à l'origine du grand pas fait dans la connaissance de leur structure, de leur variabilité et de leur importance évolutive.

a) <u>structure</u>. Toutes ces bases possèdent uniformément un résidu terminal polaire de type 1-3-dihydroxy-2 aminé :

Le nombre d'atomes de carbone des bases varie de 12 à 22. Chez les végétaux, la chaîne carbonée est souvent comprise entre  $C_{16}$  et  $C_{20}$ .

Jusqu'à ces dernières années, seules les structures de la sphingosine, de la dihydro-sphingosine et de la phytosphingosine spécifique des tissus végétaux étaient établies. Deux types principaux de bases sont distingués :

- celui de la sphinganine (1) (type dihydroxylé);

- celui de la phytosphingosine (2) ou 4-hydroxysphinganine (type trihydroxylé).

$$R - CH (OH) - CH (NH2) - CH2OH (1) R - CH (OH) - CH (OH) - CH (NH2) - CH2OH (2).$$

# TABLEAU 6

CLASSIFICATION DES BASES A LONGUE CHAINE D'APRES KARLSSON, 1970

bre de	formule de Shorthand	nom systématique	nom systématique selon IUPAC-IUB	origine	n's
Basi	es dihydro	oxylées non branchées saturée	 ک		<b>.</b>
. 12	d12:0	1.3-Dihydroxy-2-aminododecane	2X,3X-dodecasphinganine	A	Т
14	d14:0	1,3-Dihydroxy-2-aminotetradecane	2X.3X-terradecasphinganine	Â	
16	d16:0	1,3-Dihydroxy-2-aminohexadecane	2X,3X-hexadecasphinganine	A,P	
17	a17:J	1.3-Dihydroxy-2-aminoheptadecane	2X,3X-heptadecasphinganine	A,P ARP	
18	0:810	D-erythro-1,3-dibydroxy-2-aminoocladecane 1.3-Dibydroxy-2-aminoponadecane	2X.3X-nonadecasphinganine	A.P	
20	d19:0 d20:0	1,3-Dihydroxy-2-aminocicosane	2X,3X-eicosasphinganine	A,P	
Bas	es dihydr	oxylées non branchées mono-in	isaturées		
12	d12:14	1,3-Dihydroxy-2-amino-4-dodecene	2X,3X-dodeca-x-4-sphingenine	A A	ſ
14	d14:14	D-ervthro-1.3-dihydroxy-2-amino-trans-4-tetradecene	Tetradeca-4-splingenine	A	1
15	d15:14	1,3-Dihydroxy-2-amino-4-pentadecene	2X,3X-pentzJeca-x-4-sphingenine	A .	
16	d16:14	D-erythro-1,3-dihydroxy-2-amino-trans-4-hexadecene	Hexadeca-4-sphingenine	Â	
17	d17.1 d18-14	1.3-Dihydroxy-2-amino-4-neptadecene	4-Sohingenine	Â	
18	d18:1not 4	1.3-Dihydroxy-2-amino-runs - octudecene	2X.3X-sphingenine	A	
18	d18:18	1,3-Dihydroxy-2-ammo-trans-8-octadecene	2X,3X-8-sphingenine	P	Ł
19	d19:14	1,3-Dihydroxy-2-amino-4-nonadecene	2X,3X-nonadeca-x-4-sphingenine	A	
20	d20:17 d20:11	D-erythro-1,3-dihydroxy-2-amino-trans-4-eicosene	Elcosa-9-sphingenine 2X-3X-eicosa-r-1 I-sphingenine	Ā	
27	d20:14	1.3-Dihydroxy-2-anino-11-etcosene	2X,3X-docosa-x-4-sphingenine	Ā	
22	d22:19	Erythro-1,3-dihydroxy-2-amino-cis-9-docosene	erythro-docosa-cis-9-sphingenine	A	
22	d22:1 <sup>13</sup>	Erythro-1,3-dihydroxy-2-amino-cis-13-docosene	erythro-docosa-cis-13-sphingenine	A	1
Base	es dihydro	oxylées non branchées di-insa	turées	·	<b>~</b>
16	d16:2	1,3-Dihydroxy-2-aminohexadecadiene	2X.3X-hexadecasphingadienine		
10	d17:2 d18-24,14	Derythro 1 3-dihydroxy-2-amino-trans-4 cis-14-	4 Cis-14-sphingadienine	Â	
18	d18:2 <sup>4,8</sup>	D-crythro-1,3-dihydroxy-2-amino-trans-4 trans-8-	4,8-Sphingadienine	A <sup>1</sup>	
		octadecadiene	av av a stanting display		
18	d18:2-,13	1,3-Dihydroxy-Z-amino-4,13-octadecadiene	2X,3X-x-4,x-13-sphingadienine	Â	
13	d18:2	1.3-Dihydroxy-2-amino-(,12-octatecadiene	2X.3X-sphingadienine	Ä	
20	d20:24,11	1,3-Dihydroxy-2-amino-4,11-cicosadiene	2X,3X-eicosa-x-4,x-11-sphingadienine	A	
20	d20:2	1,3-Dihydroxy-2-aminoeicosadiene	2X,3X-eicosasphingadienine	P	
22	d22:2*.9	Erythro-1,3-dihydroxy-2-amino-trans-4,cis-9- docosadiene	Erythro-docosa-4, cis-9-sphingadienine	^	
22	d22:2 <sup>4,13</sup>	Erythro-1,3-dihydroxy-2-amino-trans-4,cis-13- docosadiene	Erythro-docosa-4, ets-13-sphingadienine	A ·	
Basi	es trihyd	roxylées non branchées saturé	es		<u> </u>
16	t16:0	1.3.4-Trihydroxy-2-aminohexadecane	4X-hydroxy-2X,3X-hexadecasphinganine	A,P	Т
17	t17:0	1,3,4-Trihydroxy-2-aminoheptadecane	4X-hydroxy-2X,3X-heptadecasphinganine	A,P	
18	118.0	D-ribo-1,3,4,-trihydroxy 2-aminouctadecane	4D-hydroxysphinganine 4Y-hydroxys7X-3X-nonadecasphinganine	AP	
20	120:0	D-ribo- 1,3,4-trihydroxy-2-aminoleicosane	4D-hydroxyeicosasphinganine	A.P -	
Basi	es trihyd	roxylées non branchées insatu	rées	<b>.</b>	
18	118:18	D-ribo- 1.3.4 trihydroxy-2-amino-trans-8-octadecene	4D-hydroxy-8-sphingenine	Р	Τ
Base	es dihydro	oxylées branchées saturées		r	Ŧ
17	150 01 /:U	1.3-Dihydroxy-2-amino-15-methylhexa legane	15-Methyl-2X, JX-hexadecasphinganine	A.B	1
19	iso d19:0	1-3-Dihydroxy-2-amino-17-methyloctadecane	17-Methyl-2X, 3X-sphinganine	A.B	
20	iso a20:0	1,3-Dihydroxy-2-amino-18-methylnonadecane	18-Methyl-2X,3X-nonadecusphinganine	A	1
17	anteiso d17:0	1.3-Dihydroxy-2-amino-14-methylhexadecane	14-Methyl-2X,3X-hexadecasphinganine	A	
13	anteiso 019:0	1,3-Dinydroxy-2-amino-16-methyloctadecane	15-McInyl-2X,3X-sphinganine	A	L
Bas	es dihydro	oxylées branchées insaturées			- <b>-</b>
14	iso d14:14	1,3-Dihydroxy-2-amino-12-methyl-4-tridecene	12-Methyl-2X,3X-trideca-x-4-sphingenine 13-Methyl-2X,3X-tetra turn-x-4 aphingenine	A	
17	iso d17-14	1.3-Dihydroxy-2-amino-15-methyl-4-hexadecene	15-Methyl-2X, 3X-hex2deca-x-4-sohingenine	Â	
18	iso d18:14	1,3-Dihydroxy-2-amino-16-methyl-4-heptadecene	16-Methyl-2X,3X-heptadeca-x-4-sphingenine	A	1
19	iso d19:14	1,3-Dit.ydroxy-2-amino-17-methyl-4-octadecene	17-Mcthyl-2X, 3X-r-4-sphingenine	A	1
15	anteiso d15:14	1,3-Dihydroxy-2-amino-12-methyl-4-tetradecene	12-Methyl-2X, 3X-tetradeca-x-4-sphingenine	A	1
19	anteiso di /:1	1.3-Dihydroxy-2-amino-14-methyl-4-hexadecene	14-meinyi-2A, 3A-nexadeca-x-4-sphingenine 16-Methyl-2X, 3X-4-sphingenine	Â	
20	anterso d20:14	1.3-Dihydroxy-2-amino-17-inethyl-4-nonadecene	17-Methyl-2X,3X-nonadeca-x-4-sphingenine	Ä	L
Basi	es trihyd	roxylées branchées saturées			
17	iso 117.0	1,3,4-Trihydroxy-2-anino-15-methylhexadecane	4X-hydroxy-15-methyl-2X,3X-hexadecasphinganine	A	Γ
18	iso (18:0	1,3,4-Trihydroxy-2-amino-16-methylhoptadecane	4X-hydroxy-16-methyl-2X.3X-heptadecasphinganine	A	1
21	0 יצוו סענ 10 ויצו סעו	1.3.+ i myuoxy-z-anino+17-metnyloctadecane	4A-nyuroxy-17-methyl-2X,5X-sphinganine dX-hydrayy-19-methyl-2X,3X-sphinganine	A	
ent d		I the start of the second	and story is memory and a cicouspringenine		1

A l'intérieur de ces deux classes, la longueur de la chaîne carbonée R, et le degré de saturation peuvent varier (KARLSSON, 1970 ; 1971).

b) <u>variabilité structurale</u>. Une grande variabilité structurale a été établie en considérant le comportement des bases en chromatographie sur couche mince (SAMBASIVARAO et Mac CLUER, 1963 ; KARLSSON et MARTENSSON, 1968) ou sur colonne (BARENHOLZ et GATT, 1968).

La définition de leur structure chimique et leur classification dérivent également :

- des analyses de leurs produits d'oxydation (tels les aldéhydes, alcools et acides gras homologues) par chromatographie en phase gazeuse (KARLSSON, 1971);

- des analyses de leur N-acétyl-triméthyl-silyl dérivé par couplage de la chromatographie en phase gazeuse et de la spectrométrie de masse (KARLSSON, 1970 ; 1965) ;

- et des analyses des spectres de masse après oxydation par O<sub>S</sub>O<sub>L</sub> des dérivés N-acétyl-triméthyl-silyl des bases à longue chaîne pour la localisation des doubles liaisons.

L'emploi de ces diverses techniques a permis de souligner l'ampleur de la variabilité structurale des bases (tableau 6 ). Aussi, tenant compte de la configuration et de la nature des substituants, une classification a été proposée en 1967 par la Commission de Nomenclature Biochimique (C.N.B.) de l'IUPAC-IUB. Ces caractéristiques structurales sont schématisées dans le tableau suivant :

Caractéristiques structurales	des bases à longue chaine
Terminaison polaire commune Nombre d'atomesde carbone Branchement de la chaîne paraffinique	1.3 dihydroxy-2-amino (12)-14 à 22- iso (n-1) anteiso (n-2)
Désaturation :	
monoéniques	diéniques
$- dn : 1^{\frac{4}{2} \text{ trans}}$ $- d18 : 1^{\frac{9}{2}}$ $- d18 : 1^{\frac{8}{2} \frac{9 \text{ trans}}{11}}$ $- d18 : 1^{\frac{8}{2} \frac{11}{11}}$ $- d20 : 1^{\frac{11}{12}}$ $- d22 : 1^{\frac{9}{2} \frac{13}{2} 1$	- d18 : $2^{\frac{4}{4}}$ trans, $1^{4}$ cis - d18 : $2^{\frac{4}{4}}$ trans, 8 trans - d18 : $2^{\frac{4}{4}}$ , X - d20 : $2^{\frac{4}{4}}$ , 11 - d22 : $2^{\frac{4}{4}}$ trans, 9 cis - d22 : $2^{\frac{4}{4}}$ trans, 13 cis
- uzz ; i	

Remarques : Les dénominations tiennent compte du nombre de groupes hydroxylés et de doubles liaisons contenus dans la molécule.

Ainsi, les lettres d et t correspondent respectivement aux bases di et trihydroxylées. Ces lettres sont suivies du nombre d'atomes de carbone (d18, t18 par exemple), et, comme pour les acides gras, du nombre de doubles liaisons (d18 : 0, aucune double liaison ; d18 : 1, une double liaison). La position et la géométrie de ces doubles liaisons sont représentées par un sigle. Exemple : le signe n-9 indique une double liaison en 9 à partir de l'extrémité méthylée. Les branchements sont indiqués par les lettres "br".

Selon KARLSSON, 1971, les différents types de bases à longue chaîne des céramides peuvent être classés plus simplement (tableau 5).

c) <u>importance évolutive</u>. Il s'est avéré que la position d'une ou plusieurs doubles liaisons est en relation avec l'origine taxonomique des organismes. Ainsi, une double liaison "trans" en position 8 (n-10) n'appartient qu'aux bases trihydroxylées spécifiques des végétaux qui semblent d'autre part dépourvues de bases ramifiées. Deux doubles liaisons dont une est toujours de types "trans" 4 et l'autre de type cis (n-4), (n-9) ou (n-13) ou trans (n-10) vont caractériser les bases dihydroxylées végétales. Cependant, les bases trihydroxylées saturées communément rencontrées dans les tissus végétaux, ont été récemment identifiées chez les animaux : dans le plasma sanguin (VANCE-SWEELEY, 1967), le rein de mammifères (KARLSSON-MARTENSSON, 1968 ; KARLSSON-STEEN, 1968 ; KARLSSON et coll., 1968).

L'importance évolutive des bases a été évoquée récemment. Ainsi par exemple, les gangliosides des animaux à sang chaud auraient des bases à 20 atomes de carbone, cependant que ceux des animaux à sang froid n'en possèderaient que 14 à 15.

Si on peut invoquer l'influence de l'alimentation pour expliquer la présence de la phytosphingosine dans les membranes de la muqueuse intestinale (ASSMANN-STOFFEL, 1972), les végétaux semblent, par les caractères structuraux de leurs bases, se comporter comme des intermédiaires entre organismes bactériens et animaux. Ce que montre le tableau suivant :

and the second se		terrange and the second se	the second day of the second d
Type de bases	Animaux	Plantes	Bactéries
dn : 0	+	+	+
dn : 1 <sup>4</sup>	+	+	
dn : 1 <sup>not 4</sup>	+	+	
dn : 2	+	+	
br dn : O	+		+
br dn : 1 <sup>4</sup>	+		
tn : 0	+	+	1
tn : 1		+	
br tn : 0	+		
		· · · ·	· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·

tableau : Distribution naturelle des bases majeures.

Légende : d = bases dihydroxylées - t = bases trihydroxylées br = branchements. d) <u>métabolisme des bases à longue chaîne</u>. Nous n'aborderons pas en détail le catabolisme encore mal connu des bases. Les étapes du métabolisme des bases à longue chaîne ont été précisées par BRADY et coll. (1958) et par STOFFEL (1976, 1968, 1970, 1971). Leur synthèse en présence d'acyl-coenzyme-A (pal-milyl-coenzyme-A) et de sérine conduit à un composé cétonique (MENDERSHAUSEN-SWEELEY, 1969) dont la réduction stéréospécifique en dihydrosphingosine par une S-3-déhydrosphinganine- $\beta$ -NADPH oxydoréductase précède la synthèse de la phytosphingosine (WEISS-STILLER, 1967).

Il a été établi récemment que le catabolisme de ces bases conduit à la libération d'acides gras (BARENHOLZ-GATT, 1968 ; GATT-BARENHOLZ, 1968) et d'éthanolamine (SHIMOJO et coll., 1976) par l'intermédiaire d'un mécanisme de phosphorylation consommateur d'ATP (STOFFEL, 1976).

# 2 - Distribution des acides gras :

Les connaissances de la chimie des acides gras (structure, métabolisme) sont considérablement enrichies grâce à l'application de nouvelles techniques physiques : spectroscopie en infra-rouge, résonnance magnétique nucléaire et chromatographie en phase gazeuse (GUNSTONE, 1975) où l'introduction de colonnes capillaires a , en particulier, permis une meilleure séparation de différents isomères de position des acides insaturés.

a) <u>définition</u>. On désigne d'une façon générale, sous le terme d'acide gras, toute molécule composée d'une chaîne aliphatique, saturée ou non, et portant une fonction acide carboxylique à l'extrémité de la chaîne.

La chimie des acides gras étant mieux connue que celle des bases, nous n'envisagerons donc que leur répartition dans le règne végétal et dans les glycosphingolipides.

b) <u>distribution des acides gras chez les plantes.</u> Une très grande variété d'acides gras existe à l'état naturel chez les végétaux : environ 200 acides gras ont été isolés à partir de plantes inférieures ou supérieures. Omniprésents dans tous les lipides, ils sont classés selon deux critères :
- soit leur distribution dans les tissus ;

- soit un critère chimique.

#### TABLEAU 7

CLASSIFICATION DES ACIDES GRAS MAJEURS CHEZ LES PLANTES (HITCHCOCK, 1975)

no	m commun	symboles	structure
aci	de laurique	12:0	$CH_{3}(CH_{2})_{10}COOH$
**	myristique	14:0	$CH_3$ -( $CH_2$ ) <sub>12</sub> COOH
**	palmitique	16:0	$CH_{3}-(CH_{2})_{1\overline{4}}COOH$
**	stearique	18:0	$CH_3$ -(CH <sub>2</sub> ) <sub>16</sub> COOH
**	oléique	18:1(9c)	$CH_{1}^{-}(CH_{2})_{7}CH=CH-(CH_{2})_{7}COOH$
,,	linoléique	18:2(9c,12c)	$CH_{3}^{-}(CH_{2})_{\overline{3}}(CH_{\overline{2}}^{-}CH=CH)_{\overline{2}}(CH_{2})_{\overline{7}}COOH$
**	linolénique	18:3(9c,12c,15c)	$CH_{3}(CH_{2}CH=CH)_{3}(CH_{2})_{7}COOH$

CLASSIFICATION DES ACIDES GRAS MINEURS CHEZ LES PLANTES (HITCHCOCK, 1975

			A	CIDES	GRA	ls si	ATURE	S						
nbre pair de C		1 <b>0:</b> 0		12:0		14:0		16:0		18:0		20:0	22:0	24
nbre impair de C	9:0		11:0		13:0		15:0	-	7:0		19:0			
and the second			A	CIDES	GRA	S I	NSATU	RES	barres <b>auna</b> . <b>ra</b>	&			ай ( на	
Famille en 19	arta dan araf minadan da 46	n a anna ann ann ann ann ann ann ann an	****	alanda and an an an an										
∆9-monoénvates					13:1	14:1	15 :1	16:1	17:1	18:1				
∆9-diénoates									17:2	18:2	19:2			
∆9-triénoates									17:3	18:3				
Famille en w9			1	1	<u> </u>	I			<b> </b>	l	I			<b>-</b>
w9-monoéncates w9-diénoates						14:1		16:1		18:1 18:2		20:1 20:2	22:1	
Famille en w6			<u></u>	<b>.</b>			•	L					<b></b>	-
ω6-diénoates ω6-triénoates ω6-tétraénoates ω6-pentaénoates								16:2 16:3		18:2 18:3		20:2 20:3 20:4	22:2 22:3 22:4 22:5	
Famille en w3														
ω3-triéncates ω3-tétraéncates ω3-pentaéncates ω3-héxaéncates								1 <u>6</u> :3 16:4		18:3 18:4		20:3 20:4 20:5	22:4 22:5 22:6	

Le premier critère a conduit à la classification en acides gras majeurs, mineurs et rares (ou inhabituels).

- les acides gras majeurs : ils sont largement répandus chez les végétaux, quel que soit l'organe envisagé. Leurs concentrations sont relativement abondantes. Ils sont souvent représentés par des acides monocarboxyliques saturés ou non, à chaîne linéaire, non ramifiée et à nombre pair d'atomes de carbone.

On rencontre chez les végétaux outre les acides palmitique, oléique et linoléique, qui sont prédominants (HITCHCOCK, 1975) certains acides gras majeurs ; citons des acides gras saturés :

- acide dodécanoique ou laurique ;

- hexadécanoïque ou palmitique ;
- octadécanoïque ou stéarique (omniprésents chez les végétaux)

et des acides gras désaturés :

- acide oléique : cis-9-octadécénoïque ;

- linoléique : cis-9-cis-12-octadécadiénoïque ;

- alphalinolénique : cis-9, cis-12, cis-15 octadécatriénoïque (également abondants chez les plantes).

- les acides gras mineurs : ils correspondent à des acides gras qui n'existent qu'à l'état de traces chez les végétaux. Parfois, certaines plantes supérieures sont capables d'accumuler un acide gras particulier (tableau 7 ) qui, mineur dans d'autres groupes, deviendra ici acide gras majeur (HITCHCKOCK, 1975).

- les acides gras rares : ainsi nommés en raison de leur structure particulière. Ce sont les acides gras éthyléniques conjugués ou non, les acides gras acétyléniques, les acides gras substitués (hydroxylés, époxylés, dicarboxyliques, etc...) et les acides gras à chaîne ramifiée (HITCHCOCK, 1975). Comme les précédents, leur distribution est faible mais ils peuvent devenir prédominants dans une espèce ou un organe. c) <u>distribution des acides gras dans les glycosphingolipides</u>. La distribution des acides gras peut s'effectuer au hasard entre les diverses classes de lipides, mais fréquemment, on assiste à des associations préférentielles au niveau de certains lipides. Ceci est valable quel que soit le règne considéré. Ainsi, les gangliosides des tissus du système nerveux central, possèdent presque exclusivement de l'acide stéarique (WIEGANDT, 1971). La composition en acides gras des glycosphingolipides varie selon les organes considérés, et en est spécifique (MARTENSON, 1966). Ceci est valable également au niveau du cerveau où la distribution des acides gras varie en fonction de la localisation des tissus. De même, le sexe joue un rôle dans la détermination de la structure des glycosphingolipides au niveau du foie humain (KWITEROVICH et coll., 1970) ou du rein de souris (COLES et coll., 1970).

## 3 - Métabolisme des céramides :

Les divers acides gras sont liés aux bases à longue chaîne par des acyl-transférases qui utilisent les acyl-coenzymes-A comme substrat. La spécificité de ces acyl-coenzyme-A-sphingosine-N-acyl-transférases, dirige la distribution des acides gras dans les céramides (MORELL-BRAUN, 1972).

YAVIN et GATT (1969) pensent que les céramides sont biosynthétisés par la réaction réverse de la céramidase, qui hydrolyse normalement les céramides en acides gras et en bases à longue chaîne. Cependant, ce rôle de biosynthèse des céramidases n'est qu'hypothétique, alors que leur rôle dans le catabolisme des céramides est bien défini (MORELL-BRAUN, 1972).

## III - ETUDE DE LA PARTIE HYDROPHILE DES GLYCOSPHINGOLIPIDES

## 1 - Les oligohexosylcéramides neutres :

Un grand nombre de techniques conduisant à l'isolement et à la purification des divers glycosphingolipides ont été publiées récemment (WIEGANDT, 1971 ; KATES, 1972). TABLEAU 8

CLASSIFICATION DES DIVERS GLYCOSPHINGOLIPIDES D'APRES WIEGANDT, 1971



#### a) distribution.

- distribution des monchexosylcéramides : les monoglycosylcéramides (MGCer) sont très largement répandus dans les organismes vivants. Les monogalactosylcéramides ont été identifiés chez les cryptogames inférieurs (Candida utilis ou Saccharomyces cerevisiae), chez les végétaux supérieurs (Phaseolus vulgaris) et chez les animaux (l'étoile de mer, la souris, l'homme). Les monogalactosylcéramides (Gal-Cer) représentent le constituant lipidique majeur des cellules du système nerveux central où se rencontrent également les monoglucosylcéramides (Glc-Cer) en faible quantité chez les sujets sains, en très forte quantité chez les sujets atteints de la maladie de Gaucher (DAWSON-OH, 1977). Chez l'homme, Gal-Cer et Glc-Cer appartiennent à des tissus très variés (rein, intestin, poumon, lait, sang et également au niveau des plaquettes dont ils sont le constituant majeur (KRIVIT-HAMMARSTROM, 1972; TAO et coll., 1973). Récemment, un cérébroside contenant une molécule de xylose a été isolé chez le hareng (KARLSSON et coll., 1972). Cependant que WATANABE et coll. (1976) ont identifié un fucosylcéramide dans les tissus cancéreux.

- distribution des oligohéxcsylcéramides neutres : les oligohexosylcéramides neutres peuvent se subdiviser en plusieurs séries (tableau 8 ) :

- série I pour ceux qui résultent d'additions successives de résidus glycosidiques du Gal-Cer ;

- séries II, III : 1, III : 2 qui comprennent les oligohexosylcéramides neutres issus de la substitution d'un Glc-Cer. Ces oligohexosylcéramides neutres sont fréquemment des di, tri et tétraglycosylcéramides. Mais SMITH et coll. (1975) ont isolé un heptaglycosylcéramide, et GARDAS (1976) un macroglycolipide contenant 22 résidus osidiques.

Glucose, galactose sont les constituants les plus fréquents des oligohéxosylcéramides neutres, mais ils peuvent également contenir des résidus de glucosamine et galactosamine N-acétylés et de fucose (SMITH et coll., 1975). Nous envisagerons ultérieurement les oligohéxosylcéramides contenant dans leur molécule des résidus d'inositol et de mannose qui appartiennent plutôt aux phytosphingolipides.

Les glycosphingolipides des séries I et II ont été trouvés au niveau des reins de marmifères (MARTENSON, 1969) ainsi que dans leurs poumons (ADAMS-GRAY, 1967). Seule la série II a été isolée à partir de tissus de rate, de foie et de sang (WIEGANDT, 1971).

Les séries III : 1 et III : 2 proviennent des mêmes sources, c'est-à-dire le lait, l'urine, le sérum et parfois la rate (WIEGANDT, 1971).

b) <u>métabolisme</u>. Le métabolisme des oligoglycosylcéramides a été l'objet de nombreux travaux. Ces recherches se sont heurtées à des difficultés expérimentales tenent :

- à la solubilité des substrats ;

- à la solubilité des produits de la réaction. Les lipides, produits terminaux des réactions enzymatiques peuvent ne pas avoir les mêmes caractères de solubilité que les substrats dont ils proviennent ;

- à la nature des enzymes impliquées dans le métabolisme des glycosphingolipides. Ces enzymes liées à des particules résistent en général aux conditions standardisées des processus de solubilisation (MORELL-BRAUN, 1972).

- métabolisme des galactosylcéramides (Gal-Cer) : la plupart des travaux concernant le métabolisme des Gal-Cer ont été réalisés sur les tissus du système nerveux.

La présence d'UDP galactose est nécessaire. Deux voies métaboliques sont proposées (BURTON et coll., 1958 ; MORELL-BRAUN, 1972).

- par acylation de la base (LCB) puis galactosylation

LCB + acyl-CO-A \_\_\_\_\_ céramides + Co-A Cer + UDP-Gal \_\_\_\_\_ Gal-Cer + UDP

- ou par galactosylation de la base (LCB) puis acylation :

LCB + UDP-Gal psychosine + UDP

psychosine + acyl-Co-A — Gal-Cer + Co-A

Cependant, il semblerait que la seconde voie métabolique impliquant la psychosine ait de nombreux supports expérimentaux (CLELAND-KENNEDY, 1960 ; HAMMARSTROM, 1971).

L'hydrolyse du Gal-Cer en galactose et céramide a été démontrée par HAJRA et coll. (1966). L'enzyme implique une cérébroside galactosidase d'origine lysozomale. Son activité nécessite la présence de sels biliaires. Le déficit en cette enzyme est responsable de la maladie de Krabbe chez l'homme (leukodystrophie (SUZUKI-SUZUKI, 1970).



(BUS)

Schéma de la dégradation métabolique des sphingolipides complexes Actuellement, rien ne prouve que chez les végétaux un tel processus métabolique existe.

- métabolisme des glycosylcéramides (Glc-Cer) : les Glc-Cer sont presque exclusivement rencontrés dans les tissus extra-neuraux. Leur biosynthèse est une étape fondamentale de celle des gangliosides. La glycosylation des céramides nécessite la présence d'UDP-glucose et d'une enzyme de glycosylation qui ne présente aucune spécificité quant à la nature du céramide substrat (c'est-à-dire au niveau de la longueur de chaîne des acides gras et de celle des bases).

L'enzyme hydrolysant les Glc-Cer en glucose et céramide a été purifiée à partir :

de rate humaine ;
de cerveau de boeuf ;
de foie de rat ;
de rein de rat ;
d'intestin de rat (MORELL-BRAUN, 1972).

Un déficit en glucosylcéramide glucosidase conduit à l'accumulation dans les viscères et dans la rate de Glc-Cer caractéristique de la maladie de Gaucher (BRADY et coll., 1966).

- métabolisme des oligohexosylcéramides neutres : les oligoglycosylcéramides neutres dont on a étudié le métabolisme peuvent être classés en trois groupes soit :

ceux de la série II ;
ceux de la série III ;
ceux de la série IV non sialidés.

Il est certain que l'oligosaccharide constitutif des glycosphingolipides est synthétisé par addition successive d'unités monosaccharidiques activées par un nucléotide (UDP-Glc et UDP-Gal). Ces additions successives se font par l'intermédiaire de transférases spécifiques (WIEGANDT, 1971) (tableau 9 ).

Le système multi-glycosyl-transférase suppose qu'une transférase différente est nécessaire pour chacune des étapes, et que le produit formé constituera le substrat lors de l'étape suivante. Ces enzymes transférant le même hexose, mais sur des substrats de spécificité distincte n'ont pas les mêmes exigences en ce qui concerne par exemple leurs activateurs (ions métalliques), leurs localisations subcellulaires, leurs pH optima d'action et leurs thermostabilités. Le lieu de biosynthèse de ces glycosphingolipides n'est pas encore défini : synaptosome des terminaisons nerveuses, moelle osseuse ou erythrocytes (chez les mammifères).

La partie oligosaccharidique des glycosphingolipides est dégradée par hydrolyse successive des liaisons glycosidiques des unités monosaccharidiques (tableau 9 ). Les enzymes responsables de cette hydrolyse possèdent une très grande spécificité vis-à-vis de leur substrat.

Chez l'homme, l'accumulation pathologique de glycosphingolipides est en relation directe avec la déficience totale ou partielle de l'activité d'une seule de ces enzymes.

La maladie de Fabry correspond à l'accumulation de Gal  $\alpha$  (1+4) Gal  $\beta$  (1+4) -Gle-Cer et à l'absence d'une galactose-hydrolase lysosomale spécifique du résidu terminal de ce trihexosylcéramide. Ce glycosphingolipide est retrouvé au niveau de tous les tissus du malade (c'est-à-dire foie, rate, rein, pancréas, prostate, coeur, cortex cérébral et muscles gasto-intestinaux...) (CLARKE et coll., 1976; KANO-YAMAKAWA, 1974).

D'autres accumulations irrégulières sont relatées et en particulier celle d'un tétraglycosylcéramide contenant du fucose, en relation avec une  $\alpha$ -fucosidase déficiente (WIEGANDT, 1971).

Les conditions pathologiques liées à une déficience ou un dysfonctionnement des enzymes nécessaires au catabolisme des glycosphingolipides résultent d'une inaptitude à former les entités structurales (membranaires par exemple) nécessaires.

#### 2 - Les sulfatides :

L'isolement de sulfatides et l'étude de leur structure ont été réalisés à partir de tissu de rein de mammifères (MARTENSSON, 1966 ; KARLSSON et coll., 1973). La formation des sulfatides (BALASUBRAMANIAN et coll., 1965) se fait par l'intermédiaire de l'adénosine-3-phospho-5'-phosphosulfate (PAPS)

$$Gal-Cer + PAPS \rightarrow Gal-Cer + PAP$$

La sulfatation du galactose en position 3 (STOFFYN et coll., 1971) est réalisée par une "Gal-Cer-sulfotransférase" particulaire dont le substrat est soit le Gal-Cer soit le lactosylcéramide (STOFFYN et coll., 1968).

De même l'enzyme clivant le sulfate de sulfatides, comme la plupart des hydrolases impliquées dans le catabolisme des glycosphingolipides sera de nature particulaire (MRAZ et coll., 1976). Elle présente une activité d'aryl-sulfatase A et de sulfatide-sulfatase (MRAZ-JALZKEWITZ, 1976).

## 3 - Les gangliosides :

Les gangliosides dérivent de la série IV. Ce sont donc des glycosphingolipides à acides sialiques tels :

- l'acide N-acétyl-neuraminique (NANA) dans les tissus du système nerveux central des animaux à sang chaud ;

- l'acide N-glycosyl-neuraminique (NGNA) des tissus extra-neuraux (à l'exception de l'homme où ne se rencontre que le NANA).

#### a) distribution.

- les tissus nerveux centraux possèdent des tri et tétra-glycosylcéramides sialidés composés de lactose. Une certaine variabilité structurale est observée en fonction de l'âge. Le contenu en acide sialique augmente avec l'allongement de la chaîne des bases (WIEGANDT, 1971).

- les tissus extra-neuraux sont caractérisés par la présence de gangliosides contenant du fucose.

#### b) métabolisme.

- anabolisme : l'incorporation de molécule d'acide sialique pose le problème de la succession de l'addition séquentielle d'unités monosaccharidiques quand la chaîne est ramifiée.

Deux voies sont possibles à partir du Gal-Clc-Cer par incorporation d'une Gal-NAC ou d'un acide neuraminique suivie de l'addition d'acide neuraminique ou d'une Gal-NAC pour aboutir finalement au composé suivant :

> Gal-NAC - Gal - Glc - Cer NANA

Les voies de synthèses divergent ensuite pour aboutir aux di ou aux tri-sialogangliosides.

- catabolisme : la biodégradation des gangliosides s'effectue également par étapes successives et détachement d'unités monosaccharidiques par des glycosidases de nature particulaire à pH optimum d'action inférieur à 5 (WIEGANDT, 1971).

La plupart de ces enzymes d'origine lysosomale ont été isolées à partir de foie, rein, rate, muscle et muqueuse intestinale d'animaux (WIEGANDT, 1971). Chez l'homme, les gangliosidoses sont des maladies génétiques liées à la dimi-

nution des activités d'enzymes du catabolisme et caractérisées par l'accumulation de gangliosides. Ce sont :

la maladie de Tay Sachs (SVENNERHOLM, 1962; OKADA et O'BRIEN, 1969);
la maladie de Sandhoff (CHEN TSAY-LAWSON, 1976);

- l'idiotie anaurotique infantile (BARTSCH, 1970).

# 4 - Les phytoglycosphingolipides :

Leur structure a été déterminée par CARTER et coll. (1969, 1964), elle est représentée par la figure suivante :



Leur molécule comprend essentiellement : céramide, acide phosphorique, inositol et mannose. D'après CARTER, c'est par une liaison phosphodiester que la 4-hydroxy-N-acyl-sphinganine est attachée à un oligosaccharide comprenant inositol, mannose, galactose, fucose mais aussi de l'acide hexuronique et des hexosamines.

Ils ont été identifiés dans des organismes végétaux taxinomiquement éloignés :

- Neurospora crassa (LESTER et coll., 1974);

- Saccharomyces cerevisiae (SMITH-LESTER, 1974);

- Végétaux supérieurs (CARTER et coll.; 1964, 1969).

Leur rôle est encore indéfini.

#### CHAPITRE II

- MATERIEL D'ETUDES.

L'étude que nous rapportons a été réalisée chez *Petunia hybrida* media vulgaris. Les différents clônes W166K (allèles auto-incompatibles  $S_1S_2$ ) et T2U (allèles auto-incompatibles  $S_3S_3$ ) ont été mis à notre disposition par le Professeur H.F. LINSKENS, Directeur de l'Institut botanique de l'Université des Sciences de Nimègue (Hollande) (cf. fiche technique n° 1).

Les combinaisons étudiées sont les suivantes :

- compatibles (xénopollinisation des clônes : W166K par le pollen T2U et T2U par le pollen W166K) ;

- incompatibles (autopollinisation des clônes : W166K par le pollen W166K et T2U par son propre pollen T2U).

Pollens et styles (vierges, auto et xénopollinisés après des pollinisations de 8 heures et de 24 heures) sont lyophilisés et conservés à -20°C.

Nous nous proposons essentiellement la séparation et l'identification des glycosphingolipides neutres, ce qui implique l'extraction des lipides totaux, la séparation des glycosphingolipides de ce totum et enfin le fractionnement en classes de ces lipides complexes.

## CHAPITRE III

Analyse des glycosphingolipides totaux	41
I – Extraction des lipides totaux	42
II - Obtention des glycosphingolipides totaux	43
1 - Recherche d'un protocole d'hydrolyse	43
III - Purification des glycosphingolipides totaux par chromatographie d'adsorption sur colonne d'acide silicique	46
1 - Schéma d'élution des glycosphingolipides	46
2 - Caractérisation par chromatographie en couche mince des fractions FA, FB et FC	47
IV - Dosage des glycosphingolipides totaux	48
1 - Principe de la technique de NAOI	48
2 - Résultats	49

\_00\_00\_00\_00\_

#### CHAPITRE III

- ANALYSE DES GLYCOSPHINGOLIPIDES TOTAUX -

L'isolement des glycosphingolipides totaux implique la séparation préalable des lipides des autres constituants cellulaires sans en altérer les structures.

La préservation des architectures membranaires dans laquelle les lipides endogènes sont engagés constitue un des premiers écueils auxquels l'expérimentation est confrontée.

Il est ainsi conseillé d'extraire le plus rapidement possible, dès le prélèvement, les lipides afin d'éviter l'action néfaste des températures supérieures à celles de la congélation.

D'un autre côté, l'utilisation avant toute opération extractive de la congélation est également délicate. En effet, l'intrusion de cristaux de glace est susceptible de détruire partiellement l'architecture cellulaire. D'autre part, il est souvent montré que la décongélation favorise l'activation des lipases endogènes responsables de l'hydrolyse des groupements "acyls". Une telle autolyse non physiologique des lipides peut d'ailleurs être contrôlée par l'évaluation de l'augmentation du taux d'acides gras libres qui vont s'accumuler dans ce cas.

Aussi, afin d'inhiber toute possibilité d'action enzymatique avonsnous rejeté tout protocole extractif d'un matériel même lyophilisé qui reposerait sur la présence de solvants dont le haut degré alcoolique favoriserait la dégradation du matériel et sur l'utilisation de solvants qui activeraient les lipases et les phospholipases D. PROTOCOLE D'EXTRACTION



En effet, il a été établi que les phospholipases D qui catalysent l'hydrolyse des galactosides diglycérides des tissus chlorophylliens des feuilles ont leur activité accrue par la présence de chloroforme ou de diéthyléther.

De plus, sachant que la fragilité des extraits lipidiques végétaux réside dans leur grande richesse en résidus "acyls" très désaturés et par conséquent très oxydables, ces extraits seront toujours stockés sous atmosphère d'azote à -20°C.

L'extraction des glycosphingolipides végétaux est particulière. On sait en effet qu'ils sont très fortement intégrés dans les structures membranaires (KARLSSON, 1973), aussi leur isolement exigera-t-il des conditions d'autant plus drastiques que ce sont les derniers composés extractibles, ainsi que le montre le protocole retenu (tableau 10) : glycosphingolipides des pollens et styles lyophilisés seront extraits selon les étapes suivantes :

extraction des lipides totaux ;extraction des glycosphingolipides totaux.

#### I - EXTRACTION DES LIPIDES TOTAUX

Les fleurs des clônes W166K (allèles d'incompatibilité  $S_1S_2$ ) et T2U (allèles d'incompatibilité  $S_3S_3$ ) utilisés pour cette étude sont cultivées en serre, à température et lumière contrôlées, cueillies et pollinisées selon une technique précédemment décrite (H.F. LINSKENS et coll., 1969). Après des temps de pollinisation de 0 heure (styles vierges témoins), 8 et 24 heures, les styles auto et xénopollinisés sont lyophilisés et stockés à -20°C.

Les lipides des styles (2 g) et des pollens (1 g) sont rapidement extraits selon la technique de FOLCH (1957) modifiée par KARLSSON (1973) (fiche technique n° 2) par le mélange solvant CHCl<sub>3</sub>-CH<sub>3</sub>OH (2 : 1 , v/v à raison de 20 ml de solvant par gramme de tissu lyophilisé et pendant 20 minutes). Après plusieurs homogénéisations et filtrations, le résidu sec est chauffé à reflux en présence du mélange chloroforme-méthanol (1 : 1 , v/v). Les lipides totaux sont recueillis dans une phase inférieure chloroformique après lavage par une solution  $CHCl_3-CH_3OH-NaCl 9 \% (3 : 47 : 48 , v/v/v)$  et évaporés à sec ; ils sont repris dans un petit volume du premier solvant d'extraction et conservés à -20°C sous atmosphère d'azote.

#### II - OBTENTION DES GLYCOSPHINGOLIPIDES TOTAUX

L'obtention des glycosphingolipides totaux à partir d'un extrait lipidique total tel qu'il a été précédemment préparé, exige leur séparation des glycérophosphatides. En se basant sur l'alcali résistance des glycosphingolipides dûe à la présence d'une liaison amide, les glycérophosphatides seront éliminés par saponification en milieu basique.

Nous avons donc recherché un protocole d'hydrolyse assurant un bon isolement des glycosphingolipides à partir des extraits de pollens et de styles.

#### 1 - Recherche d'un protocole d'hydrolyse :

Plusieurs protocoles d'hydrolyse douce sont connus et ont été testés. Nous rapportons ci-après les principes des méthodes proposées par ROUSER (1967), DAWSON (1967), SUGITA (1974) et de KARLSSON (1973).

a) <u>méthode de ROUSER (1967)</u>. Les lipides dissous dans le tétrachlorure de carbone (0,8 ml) sont hydrolysés par une solution hydroalcoolique de NaOH N pendant 20 minutes à 37°C. Après arrêt de la réaction par addition d'éthylformate (0,4 ml) et évaporation, le résidu lipidique est isolé par déphasage après addition de 1 volume d'eau et 2 volumes du mélange isobutanol/chloroforme (1 : 2, v/v).

b) <u>méthode de DAWSON (1967)</u>. Cette deuxième méthode est une variante de la précédente. Les lipides, après évaporation à sec, sont repris et hydrolysés une nuit, à 37°C, par une solution de potasse (KOH 1N) dans le mélange méthanol-eau (1 : 1, v/v).

# OBTENTION DES GLYCOSPHINGOLIPIDES TOTAUX

TABLEAU 11





Après addition de chloroforme et déphasage, les glycosphingolipides totaux contenus dans la phase organique inférieure sont recueillis, évaporés à sec et le résidu conservé à -20°C sous atmosphère d'azote.

c) <u>méthode de SUGITA (1974)</u>. Les lipides sont hydrolysés 1 heure à 37°C en présence de soude 1N dans le mélange solvant chloroforme-méthanol (2 : 1, v/v). La réaction est arrêtée en acidifiant le milieu jusqu'à pH 4 par HCl 1N. Après addition de 4 volumes de mélange solvant  $CHCl_3-CH_3OH$  (2 : 1, v/v) et déphasage, la phase inférieure chloroformique est dialysée contre de l'eau distillée à 4°C pendant 20 heures.

La phase inférieure contenant les glycosphingolipides est évaporée à sec et le résidu est repris par le mélange  $CHCl_3-CH_3OH$  (2 : 1, v/v).

Les phases inférieures (glycosphingolipides totaux non purifiés) sont chromatographiées en couche mince dans le système solvant classique chloroforme-méthanol-eau (65 : 25 : 4, v/v/v). L'identification des lipides en général et celle des glycosphingolipides et des phospholipides sera réalisée par les réactifs spécifiques (fiche technique n° 6).

Les trois méthodes proposées par ROUSER, DAWSON et SUGITA présentent des inconvénients majeurs tels l'insuffisance de l'hydrolyse alcaline douce vis-à-vis de la résistance des lécithines qui ne seront pas totalement détruites, ou l'altération des copules glucidiques des mono et diglycosylcéramides.

C'est pourquoi nous leur avons préféré le protocole de KARLSSON (1973) qui assure, avec le maximum d'efficacité, l'hydrolyse des phospholipides tout en évitant les phénomènes d'autooxydation.

d) <u>protocole de KARLSSON (1973)</u>. Ce protocole est décrit dans la fiche technique n° 3 et résumé tableau 11 .

Les lipides totaux sont soumis à une hydrolyse alcaline douce en présence de potasse alcoolique (KOH 0,1 M dans le mélange  $CH_3OH-H_2O$  9 : 1, v/v). Après

18 heures d'hydrolyse sous atmosphère d'azote et à l'obscurité, arrêt de la réaction et déphasage, les glycosphingolipides totaux sont recueillis dans la phase organique.

Une partie aliquote de la phase supérieure est analysée par chromatographie en couche mince dans le système solvant  $CHCl_3-CH_3OH-H_2O$  (65 : 25 : 4, v/v/v). L'absence de glycosphingolipides est vérifiée par révélation des plaques par leurs réactifs spécifiques tels que les réactifs à l' $\alpha$ -naphtol, à la benzidine et à l'acétate cuprique (fiche technique n° 6). L'absence de bases à l'état libre est également contrôlée par pulvérisation des plaques par le réactif à la ninhydrine (fiche technique n° 6). Une partie aliquote de la phase inférieure permet, après chromatographie en couche mince, l'identification des glycosphingolipides séparés.

Toutes les classes de glycosphingolipides : céramides, mono, di, tri et tétraglycosylcéramides ainsi que des lipides très polaires ont été identifiés. L'éventuelle présence de produits issus de l'hydrolyse incomplète des lipides et solubles dans les solvants organiques doit être recherchée. Ceux-ci proviennent des phospholipides (lysolécithine, lécithine, phosphatidyl-éthanolamine, phosphatidyl-sérine, phosphatidyl-inositol et acide phosphatidique), des lipides simples (triglycérides, cholestérol) et des caroténoides.

C'est pourquoi, ces diverses classes de lipides ont été également soumises à l'hydrolyse alcaline douce selon KARLSSON, et les produits de dégradation analysés et identifiés par chromatographie sur couche mince dans deux systèmes solvants différents :

- système solvant des phospholipides selon ROUSER (1967)

 $CHCl_{3}-CH_{3}OH-NH_{4}OH \neq N$  115 : 45 : 7,5 ( $\nu/\nu/\nu$ )

- système solvant des glycosphingolipides

 $CHCl_{3}-CH_{3}OH-H_{2}O$  65 : 25 : 4 (v/v/v).

A l'exception du cholestérol non touché par l'hydrolyse alcaline douce, tous les autres lipides cités étant détruits, ne migrent plus dans leur système solvant classique. Pour ce qui concerne l'expérimentation, nous nous sommes toujours placée dans des conditions de concentration telles que la présence de produits de dégradation devenait très improbable. Cependant une étape de purification s'avère indispensable. ANALYSE PAR CHROMATOGRAPHIE EN COUCHE MINCE DES FRACTIONS FA, B ET C SEPAREES SUR COLONNE D'ACIDE SILICIQUE



Plaque de gel de silice G activée 1 heure à 120°C solvant :  $CHCl_3-CH_3OH-H_2O$  (65 : 25 : 4, v/v/v) migration : 13 cm révélation : réactif à la Rhodamine 6G

FA : fraction A

```
L<sup>x</sup> : lécithine hydrolysée partiellement par le réactif alcalin (fiche n° 3)
```

PI<sup>x</sup> : phosphatidyl-inositol hydrolysé partiellement

PE<sup>×</sup> : phosphatidyl-éthanolamine hydrolysée partiellement

- FB : fraction B
- FC : fraction C



# III- PURIFICATION DES GLYCOSPHINGOLIPIDES TOTAUX PAR CHROMATOGRAPHIE D'AD-SORPTION SUR COLONNE D'ACIDE SILICIQUE

L'examen des chromatoplaques (CCM) des extraits de lipides totaux des pollens et des styles met en évidence la contamination des glycosphingolipides par :

- des acides gras libérés lors de l'hydrolyse alcaline douce des lipides totaux ;

- du cholestérol accompagné de stérols alcalis-résistants ;

- de pigments (chlorophylles dans les extraits stylaires ; caroténoïdes, particulièrement abondants dans les extraits polliniques).

Signalons également la présence d'un composé de nature indéterminée remarquable par sa migration entre les céramides monchexosides et le cholestérol et par son caractère  $\alpha$ -naphtol positif. Ce composé semble analogue à celui que VAN DESSEL (1977) a également mis en évidence.

Une étape supplémentaire de purification de ces glycosphingolipides par chromatographie sur colonne d'acide silicique est donc indispensable. Cette méthode de fractionnement basée sur le principe de la chromatographie d'adsorption est très fréquemment employée et nous l'avons retenue.

## 1 - Schéma d'élution des glycosphingolipides :

Un essai préliminaire calqué sur le même modèle d'extraction, d'hydrolyse alcaline douce et de purification sur colonne d'acide silicique, a été expérimenté sur des tissus non chlorophylliens (pommes) et fortement chlorophylliens (épinards). Ainsi avons-nous déterminé les volumes exacts de solvants nécessaires à une élution et à une purification satisfaisantes des glycosphingolipides.

Le protocole de KARLSSON a été retenu (tableau 12). Les glycosphingolipides obtenus après hydrolyse alcaline douce sont chromatographiés directement sur colonne d'acide silicique 100 mesh, équilibrée en chloroforme (fiche technique n° 4). Par passage de solvants de polarité croissante, trois fractions seront obtenues. Ainsi pour une charge lipidique de 100 mg, l'élution est assurée par le passage successif, pour 1 gramme d'acide silicique de : - 10 ml de chloroforme : ce premier éluat ou fraction FA contient les acides gras, le cholestérol, les stérols et la plus grande partie des pigments ;

- 10 ml du mélange CHCl<sub>3</sub>-CH<sub>3</sub>OH (1 : 3, v/v) constitueront le second éluat qui renferme des glycosphingolipides (fraction FB) ;

- 10 ml de méthanol enfin entraîneront les glycosphingolipides encore adsorbés. Cette dernière fraction est appelée FC.

Ainsi, les lipides neutres peu polaires sont élués les premiers tandis que les lipides les plus polaires le sont en dernier.

# 2 - Caractérisation par chromatographie en couche mince des fractions FA, FB et FC :

Les constituants de ces trois fractions sont identifiés par chromatographie en couche mince de gel de silice dans le solvant  $CHCl_3-CH_3OH-H_2O$  (65 : 25 : 4, v/v/v) et par co-migration avec plusieurs témoins :

- phospholipides hydrolysés (phosphatidyl-éthanolamine, phosphatidyl-inositol) ;

- lipides neutres hydrolysés (tri-glycérides, cholestérol) ;

- glycosphingolipides (céramides, monoglycosylcéramides, diglycosylcéramides et extraits de cerveau de chez Sigma).

Les résultats sont reportés dans le tableau 12.

Ainsi, acides gras libres, cholestérol et la majeure partie des pigments appartiennent bien à la fraction FA, cependant que glycosphingolipides et les pigments résiduels sont caractérisés dans les fractions FB et FC.

Il s'est avéré que chacune des deux fractions FB et FC demeurent encore souillées par des traces de pigments. En effet, ces pigments ne peuvent pas être élués au niveau de la fraction FA en augmentant le volume éluant. Seule l'augmentation de la polarité du mélange solvant (addition de deux pour cent de méthanol au chloroforme) permet l'élution de quelques pigments résiduels mais, dans ce cas les céramides peu polaires sont également élués.

Les glycosphingolipides sont donc à ce stade encore contaminés par la présence de quelques pigments. IV - DOSAGE DES GLYCOSPHINGOLIPIDES TOTAUX

Leur dosage nous a paru intéressant afin de mieux comprendre leur éventuelle participation au métabolisme perturbé qui accompagne la pollinisation incompatible.

On sait que les glycosphingolipides constituent une classe de lipides complexes caractérisés par l'omniprésence de N-acyl-sphingosine.

Selon les modes de liaison de cette base avec des hexoses, des hexoses estérifiés, des oligosaccharides à acide sialique ou à la phosphocholine, on distingue respectivement des glycosphingolipides neutres, acides (sulfatides), gangliosides ou même sphingomyélines. Mais, quelle que soit la nature ou la concentration de ces substituants dans les extraits de pollens ou de styles analysés, chaque molécule de sphingolipide ne renfermera qu'une seule molécule de sphingosine. Aussi son dosage exprimera-t-il celui des glycosphingolipides.

D'autre part, le choix de la technique de dosage dépendra d'un certain nombre de critères classiques : sensibilité, reproductivité, spécificité et rapidité d'exécution. Aussi, parmi les nombreuses techniques de dosage proposées (fiche technique n° 9) avons-nous retenu celle de NAOI (1974) qui possède les qualités recherchées.

## 1 - Principe de la technique de NAOI :

Ce dosage repose sur l'évaluation de l'intensité de fluorescence émise par la sphingosine inclue dans un complexe formé avec la fluorescamine ; cette intensité est proportionnelle à la quantité de sphingosine.

La réalisation du dosage nécessite, dans une première étape, la libération de la sphingosine par hydrolyse acide. Afin de minimiser les interférences qui pourraient être apportées par l'éventuelle présence d'hexosamines (appartenant à la structure des glycosphingolipides) ou par celle d'amines primaires hydrosolubles (issues de l'hydrolyse de contaminants), la sphingosine ainsi libérée est extraite par le diéthyl-éther.
# DISTRIBUTION DES TENEURS EN GLYCOSPHINGOLIPIDES TOTAUX DANS

# LES STYLES ET LES POLLENS

	GSL Totaux							
Matériel utilisé	n moles par g de tissu	n moles par taux relatifs g de tissu /styles vierges /						
Styles vierges WI66K	522,1	1,000						
Pollen W166K	653,8	1,252						
Pollen T2U	568,5	1,088						
Styles autopollinisés 8h WI66K x WI66K	346,8	0,634	0,675					
Styles xénopollinisés 8h WI66K x T2U	513,6	0,983	1,000					
Styles autopollinisés 24h WI66K x WI66K	421,5	0,807	0,815					
Styles xénopollinisés 24h WI66K x T2U	516,6	0,989	1,000					
Styles autopollinisés 24h T2U x T2U	636,5		0,811					
BUS T2U x W166K	784,3		1,000					

Dans une deuxième étape, la sphingosine sera complexée avec la fluorescamine et la fluorescence de la sphingosine est dosée dans ce complexe par spectrofluorimétrie pour une longueur d'onde d'excitation de 385 nm et une longueur d'onde d'émission de 480 nm. Les spectres d'émission et d'excitation, ainsi que la linéarité de la courbe étalon ont été vérifiés et sont présentés sur les diagrammes (fiche technique n° 9).

Les résultats des dosages fluorimétriques des glycosphingolipides totaux des différents extraits de pollens et de styles vierges auto et xénopollinisés, sont exprimés en nanomoles de glycosphingolipides par gramme de tissu lyophilisé (tableau 13).

Le contrôle de la spécificité du dosage est effectué par l'établissement d'une gamme étalon en présence ou en l'absence de pigments, ce qui a permis d'établir que l'existence de chlorophylle dans le milieu ne perturbe aucunement le dosage des glycosphingolipides.

### 2 - Résultats :

La comparaison des résultats des dosages fluorimétriques des glycosphingolipides totaux dans les extraits polliniques montre que le pollen W166K (S<sub>1</sub>S<sub>2</sub>) est nettement plus riche en ces composés lipidiques que le pollen T2U (S<sub>3</sub>S<sub>3</sub>).

D'autre part, la comparaison entre extraits polliniques et extraits de styles vierges met en évidence une teneur en glycosphingolipides plus élevée dans le pollen (notamment dans le pollen W166K par rapport aux styles de même génotype).

Cependant, la comparaison la plus intéressante est celle des teneurs des extraits de styles vierges par rapport à celles des extraits de styles pollinisés où, dans l'ensemble, une diminution des teneurs est observée.

A la suite de cette observation une tentative d'analyse plus fine a été recherchée dans la confrontation des résultats des dosages fluorimétriques relevés en fonction du temps de pollinisation (8 heures et 24 heures) avec ceux des styles vierges (considérés comme témoins du temps zéro). TENEURS RELATIVES DES GLYCOSPHINGOLIPIDES TOTAUX PAR RAPPORT

A CELLES DES STYLES VIERGES.



(BUS) ULLE FIGURE 6

# CINÉTIQUE DU MÉTABOLISME DES GLYCOSPHINGOLIPIDES TOTAUX



A CELLES DES CROISEMENTS COMPATIBLES





Il apparaît (figures 5 et 6 ) que la xénopollinisation est caractérisée par une baisse très légère de la teneur en glycosphingolipides de 0 à 8 heures, puis les valeurs relevées augmentent et au bout de 24 heures de pollinisation elles sont très voisines des valeurs initiales.

Dans ces mêmes conditions, l'autopollinisation est marquée par une diminution des teneurs en glycosphingolipides par rapport au temps zéro (styles vierges) qui est de 34 % après 8 heures et de 19,3 % après 24 heures de pollinisation incompatible. Ainsi, l'autopollinisation est nettement marquée par une forte diminution des teneurs en glycosphingolipides totaux et la légère augmentation observée de 8 heures à 24 heures ne conduit cependant qu'à des valeurs inférieures à celles qui caractérisent les extraits de styles vierges.

Le comportement des styles après autopollinisation et xénopollinisation est schématisé dans la figure 6.

Cette diminution des teneurs semble bien caractériser l'autopollinisation, c'est ce qu'exprime les histogrammes de la figure 7 où les teneurs en glycosphingolipides totaux sont exprimés par rapport aux teneurs en glycosphingolipides totaux des styles xénopollinisés.

En résumé, l'étude analytique des glycosphingolipides des pollens et des styles de *Petunia* autorise la mise en valeur de quelques faits intéressants :

- différences quantitatives entre les pollens : le pollen W166K (S $_1\rm S_2$ ) est nettement plus riche en lipides que le pollen T2U (S $_3\rm S_3$ ) ;

- différences quantitatives entre pollens et styles vierges : ici aussi les résultats sont nets ; les pollens sont toujours plus riches que le style vierge en glycosphingolipides totaux ;

- différences quantitatives entre styles vierges et styles pollinisés : les différences sont également nettes, la pollinisation entraîne une diminution des glycosphingolipides. Cette diminution est très marquée dans le cas de l'autopollinisation, puisqu'elle atteint 34 % après 8 heures de pollinisation et encore environ 20 % après 24 heures.

# CHAPITRE IV

-	Analyse des glycosphingolipides neutres et acides	51
	I - Fractionnement en glycosphingolipides neutres et acides	51
	<ol> <li>Chromatographie sur colonnes de DEAE-Cellulose des glycosphingolipides des fractions FB et FC</li> </ol>	52
	2 - Caractérisation des fractions FD et FE par chromatogra- phie en couche mince	52
	II - Deserve des alussentingelinides noutures et reiden	52
	11 - Dosage des glycosphingolipiaes neutres et actaes	2.3
	1 - Résultats des dosages des glycosphingolipides acides	54
	2 - Dosages des glycosphingolipides neutres totaux	54
	III - Composition en acides gras des glycosphingolipides neutres	55
		00
	1 - Hydrolyse acide des glycosphingolipides	55
	2 - Extractions, transméthylation et purification des acides	56
		50
	5 - Unromatographie des acides gras en phase gazeuse	56
	4 - Conclusions	61

\_00\_00\_00\_00\_

# CHAPITRE IV.

### ANALYSE DES GLYCOSPHINGOLIPIDES NEUTRES ET ACIDES

L'hypothèse de la participation des glycosphingolipides au métabolisme nouveau qui caractérise l'incompatibilité peut être avancée en tenant compte de l'évolution globale des teneurs en glycosphingolipides des styles autopollinisés.

Une étude plus précise de ces lipides complexes impose une meilleure connaissance des différentes catégories qui les composent, c'est-à-dire le fractionnement des glycosphingolipides totaux en ses constituants neutres et acides.

### I - FRACTIONNEMENT EN GLYCOSPHINGOLIPIDES NEUTRES ET ACIDES

Ces lipides complexes étant essentiellement des molécules amphipathiques, nous avons utilisé pour leur fractionnement une technique souvent proposée : la chromatographie d'échange ionique. Ainsi les glycosphingolipides, précédemment purifiés par chromatographie sur colonne d'acide silicique seront fractionnés sur colonne d'échangeur d'ions et trois grands groupes de lipides seront ainsi isolés :

- lipides neutres (non ionisés et non ionisables) ;

- lipides zwitterioniques ;

- lipides acides.

### FIGURE 8

ANALYSE PAR CHROMATOGRAPHIE EN COUCHE MINCE DES FRACTIONS D ET E SEPAREES SUR COLONNE DE DEAE-CELLULOSE



Plaque de gel de silice G activée 1 heure à 120°C solvant :  $CHCL_3 - CH_3OH-H_2O(65 : 25 : 4, v/v/v)$  migration : 13 cm révélation : réactif à la Rhodamine 6G

RI

Ces fractions lipidiques pourront à leur tour être fractionnées en fonction du caractère plus ou moins polaire et/ou acide de leur molécule.

## 1 - Chromatographie sur colonne de DEAE-Cellulose, des glycosphingolipides des fractions FB et FC :

Les fractions FB et FC précédemment éluées sont réunies et chromatographiées sur colonne d'échange ionique selon le protocole proposé par KARLSSON et coll. (1973) (fiche technique n° 5). La diéthylamino-éthyl-cellulose (DEAE-Cellulose) préparée selon KARAN et LESTER (1975) est utilisée sous forme acétate et équilibrée dans le mélange solvant CHCl<sub>3</sub>-CH<sub>3</sub>OH (2 : 1, v/v). La chromatographie est effectuée selon les conditions suivantes :

- charge en lipides de la colonne : 50 mg par gramme de DEAE-Cellulose ; - élution assurée par le passage successif d'un premier mélange éluant  $CHCl_3-CH_0OH$  (2 : 1, v/v) à raison de 100 ml par gramme de cellulose ; puis le méthanol contenant 5 % en poids de LiCl, à raison de 25 ml d'éluant par gramme de cellulose.

Deux fractions FD et FE sont respectivement obtenues (figure <sup>8</sup>): la première contient les glycosphingolipides neutres, la seconde les glycosphingolipides acides.

### 2 - Caractérisation des fractions FD et FE par chromatographie en couche mince :

Les deux fractions FD et FE ont été analysées par chromatographie en couche mince sur gel de silice dans le système solvant classique  $CHCl_3 - CH_3OH - H_2O$  (65 : 25 : 4, v/v/v).

La fraction FD est débarrassée de la plupart des pigments, elle correspond aux glycosphingolipides neutres : céramides, mono, di, tri et tétraglycosylcéramides et lipides polaires.

La fraction E comprend essentiellement les sulfatides et également des pigments contaminants. Les résultats de ces analyses chromatographiques sont reportés figure 8. II - DOSAGE DES GLYCOSPHINGOLIPIDES NEUTRES ET ACIDES

Il nous a paru intéressant de doser les glycosphingolipides acides et neutres afin de comparer leur importance relative dans les pollens et dans les styles vierges, auto et xénopollinisés. Ce dosage a été effectué selon la méthode fluorimétrique décrite par NAOI (1974) et telle que nous l'avons précédemment appliquée aux glycosphingolipides totaux.

Les résultats concernant les dosages des glycosphingolipides acides et neutres sont consignés dans le tableau suivant.

	GSL	neutres to	taux -	GSL acides totaux					
Types d'extraits	nmoles/ g tissu	relatif/ croisement compatible	relati6/ styles vierges	nmoles/ g tissu	relati{/ croisement compatible	relati6/ styles vierges			
Styles vierges W166K	473,1		1,000	48,74		1,000			
Pollen W166K	611			42,56					
Pollen T2U	512,8		· ·	55 <b>,</b> 82					
W166K.W166K 8 heures	302 <b>,</b> 9	0,616	0,640	43,64	2,00	0,895			
W166K.T2U 8 heures	491,6	1,000	1,039	21,83	1,00	0,447			
W166K.W166K 24 heures	393,6	0,816	0,832	27,83	0,81	0 <b>,</b> <u>5</u> 71			
W166K.T2U 24 heures	482,1	1,000	1,019	34,47	1,00	0,707			
T2U.T2U 24 heures	T2U eures 610,1 0,797								
T2U.W166K 24 heures	765	1,000							

1997 - S

FIGURE 9

CINÉTIQUE DU MÉTABOLISME DES GLYCOSPHINGOLIPIDES ACIDES TOTAUX



### 1 - Résultats des dosages des glycosphingolipides acides :

L'examen du tableau précédent est intéressant. Nous constatons en effet qu'au niveau des dosages des sulfatides les styles vierges (W166K) sont relativement plus riches que le pollen de même génotype. Le pollen T2U est lui caractérisé par sa richesse en sulfatides.

Les pollinisations compatibles et incompatibles s'accompagnent de variations des teneurs en fonction du temps de pollinisation. Ainsi, la xénopollinisation, malgré l'apport d'un pollen relativement plus riche en sulfatides, montre une forte diminution de ces glycosphingolipides acides après 8 heures de pollinisation (55 % environ). Les diminutions des teneurs en sulfatides ne sont plus que d'environ 30 % après 24 heures.

Par contre, au cours de l'autopollinisation les teneurs en sulfatides diminuent lentement de 0 à 8 heures (10,5 %) puis cette diminution des teneurs s'accuse fortement de 8 heures à 24 heures (43 % environ).

Ces différences de comportement des sulfatides au cours de l'auto et de la xénopollinisation sont nettement apparentes dans la figure 9.

# 2 - Dosages des glycosphingolipides neutres totaux :

Les résultats des dosages sont exprimés également en nanomoles par gramme de tissu lyophilisé. L'examen de la variation des teneurs relatives montre que ces hétérolipides ont un comportement identique à celui des glycosphingolipides totaux.

L'autopollinisation notamment, s'accompagne d'une diminution des teneurs en glycosphingolipides neutres totaux indépendamment du génotype du style pollinisé. Cette diminution est d'ailleurs très prononcée dès les 8 premières heures de pollinisation incompatible (36 %), elle sera plus faible (17 % environ) de 8 à 24 heures.

En résumé, il est dans l'état actuel de nos connaissances sur les glycosphingolipides acides, prématuré d'émettre une hypothèse concernant la différence de comportement de ces glycosphingolipides après 8 heures de pollinisation. Nous ne pouvons que constater que leurs teneurs allaient en diminuant constamment au cours de l'autopollinisation.

Par contre, il est évident que quelle que soit la nature du glycosphingolipide considéré, la pollinisation compatible ou incompatible est en relation avec des variations quantitatives des teneurs de ces glycosphingolipides acides ou neutres. Aussi, afin de vérifier si les variations observées pouvaient être qualitatives, nous avons entrepris l'étude des acides gras des glycosphingolipides neutres totaux.

### III - COMPOSITION EN ACIDES GRAS DES GLYCOSPHINGOLIPIDES NEUTRES TOTAUX

Le comportement des glycosphingolipides neutres et acides, après autopollinisation, nous a conduit à envisager l'analyse qualitative de ces hétérolipides. La recherche de techniques bien adaptées à notre matériel et les faibles concentrations de nos extraits en sulfatides ont été déterminantes dans l'orientation momentanée de nos investigations vers l'étude des glycosphingolipides neutres. Cependant, l'isolement et l'identification ultérieure de leurs constituants (acides gras, bases à longues chaînes et copule osidique) et la confrontation des résultats en fonction du pollen, des styles et de la pollinisation ne peut être comprise qu'après l'établissement de la composition en acides gras des glycosphingolipides neutres totaux.

# 1 - Hydrolyse acide des glycosphingolipides :

La connaissance de la composition en acides gras repose sur la libération de ces constituants ; différentes méthodes sont proposées et ont été discutées dans l'appendice technique (fiche n° 10). La recherche d'une technique d'hydrolyse a été dominée par la difficulté de rompre la liaison entre acides gras et bases qui va exiger des conditions d'hydrolyse plus brutales que celles qui sont appliquées à la rupture des liaisons O-acyl-esters. C'est pourquoi nous avons retenu le protocole d'hydrolyse établi par GAVER et SWEELEY (1965).

### 2 - Extraction, transméthylation et purification des acides gras :

L'extraction des acides gras de l'hydrolysat refroidi est réalisée par addition de n-hexane. Les deux phases vont donc correspondre respectivement à une phase supérieure hexanique qui retiendra les acides gras apolaires et une phase méthanolique inférieure où se situeront oses et bases à longue chaîne libres.

La présence d'eau dans le réactif d'hydrolyse conduit à la formation d'acides gras libres partiellement méthylés. Or, la fixation d'un groupement méthyle sur la fonction acide des acides gras rend ces composés plus volatiles. Or, l'abaissement de la température de vaporisation, et la diminution des effets d'adsorption sur le support sont indispensables à une bonne analyse chromatographique en phase gazeuse.

Aussi, les acides gras extraits sélectivement par le n-hexane vont être transestérifiés (fiche technique n° 11) par le mélange méthanol-acide sulfurique. La transméthylation n'étant jamais complète, puisqu'il s'agit d'un équilibre, il est indispensable de purifier les esters méthyliques d'acides gras formés afin d'éliminer les acides gras non méthylés et les éventuels contaminants. Cette purification est effectuée par chromatographie en couche mince sur gel de silice G avec le benzène comme solvant de migration (fiche technique n° 11). Après élution, les esters méthyliques d'acides gras sont repris par le sulfure de carbone et chromatographiés en phase gazeuse (fiche technique n° 12).

# 3 - Chromatographie des acides gras en phase gazeuse :

La composition en acides gras des glycosphingolipides neutres totaux a été établie par chromatographie en phase gazeuse sur un appareil VARIAN 1800, équipé d'un détecteur à ionisation de flamme, sur colonne standard de diéthylèneglycol-succinate (DEGS) à 10 % en poids sur chromosorb W 60/80 mesh A.W. Les conditions sont les suivantes (fiche technique n° 12) :

- température d'analyse : 176°C ;
- température de l'injecteur : 210°C ;
- température du détecteur : 220°C ;
- débit du gaz vecteur (azote) : 25 ml/mn à la sortie de la colonne.

# TABLEAU 14

# ACIDES GRAS DES GLYCOSPHINGOLIPIDES NEUTRES DES POLLENS,

# STYLES VIERGES, AUTOPOLLINISÉS ET XÉNOPOLLINISÉS.

Trange, comence	ACIDES GRAS	Styles vierges	Styl	es 8h		Styles	Pollens				
		MICCI	W166K	WI66K	W166K	W166K	T2U	T2U			
	ANAL 1 SES		WI66K	W166K	T2U	W166K	T2U	WIGGK	T2U	WI66K	T2U
Looven an web-dog	nne an fan fan de fan an fan seine an general yn fan general fan de f	14.0	0.70	4.04		0.00	0.00	0.07	4.00	0.00	0.00
ac	myristique	14:0	2,76	1,64	1,11	0,26	3,06	0,97	4,06	2,06	2,03
90	myristoléique	14:1	1,74	3,13	2,16	0,20	1,13	0,57	2,74	0,98	0,76
ac	pentadécanoïque	15:0	1,84	1,80	1,07	0,09	1,67	0,54	1,74	0,92	1,00
ac	palmitique	16:0	22,10	13,23	16,28	1,44	28,39	5,56	16,67	20,31	19,30
ac	palmitoléique	16:1	3,28	2,06	2,29	2,14	6,66	1,21	4,44	2,74	4,27
ac	heptadécanoïque	17:0	1,46	11,27	1,32	0,14	0,74	1,06	1,24	0,73	0,46
ac	stéarique	18:0	15,32	7,47	11,17	0,80	12,38	7,04	7,96	7,73	8,98
ac	oléïque	18:1	14,18	9,77	13,97	3,48	20,63	12,35	8,48	16,40	14,29
ac	linoléïque	18:2	6,64	5,26	9,79	2,36	8,71	8,54	4,27	10,26	6,24
ac	linolénique	18:3	2,44	5,66	4,93	1,26	4,36	4,34	2,27	7,46	4,16
ac	anachidique	20:0	8,82	13,45	18,63	35,55	3,09	34,11	15,57	3,26	2,65
ac	homogammalinolènique	20:3	19,34	25,22	17,18	52,26	9,17	23,70	30,53	27,14	35,85
ac	+ behenique	+ 22:0									
τοταυχ			99,92	99,96	99,95	99,98	99,99	99,99	99,97	99,99	99,99
							1	1			

BIN



FIGURE 10

L'identification des acides gras dans un extrait représente toujours un stade délicat de l'analyse ainsi qu'il en est discuté dans l'appendice technique. C'est par référence à des esters méthyliques étalons et par comparaison des temps de rétention relatifs, que ces acides gras ont été identifiés. Nous nous sommes limités à l'identification des acides gras majeurs présents dans cette classe de lipides neutres. Ceci explique que les résultats exprimés en pourcentage et présentés tableau 14 , soient légèrement surestimés par rapport aux taux réels qui comprennent des acides gras mineurs notamment les acides gras courts ou très longs.

Par souci de clarté, les variations de composition en acides gras des styles et pollens et celles des styles auto et xénopollinisés en fonction du temps de pollinisation sont schématisées dans les figures 10,11,12,13 et 14.

Pour des commodités d'expression des résultats, nous avons réparti les acides gras en acides gras à chaînes courtes (inférieures à 18 atomes de carbone) et à chaînes longues (supérieures à 18 atomes de carbone).

L'examen de ces schémas s'est avéré intéressant par les données qu'ils apportent concernant l'analyse des acides gras constitutifs des glycosphingolipides neutres. Des comparaisons sont effectuéesentre les schémas issus des chromatogrammes des extraits de pollens et de styles vierges, puis de ceux de styles vierges et de styles pollinisés.

### a) comparaison des compositions en acides gras des glycosphingolipides neu-

tres des styles vierges et des pollens. Les extraits de pollens et de styles vierges apparaissent qualitativement homogènes par leur composition en acides gras saturés ou insaturés, mais nettement hétérogènesquantitativement.

En effet, les glycosphingolipides neutres des styles vierges sont caractérisés par une richesse relative en acides gras saturés : acide stéarique, C18 : 0 (15,3 %) et en acide arachidique, C20 : 0 (8,8 %).

Inversement, ceux des pollens sont caractérisés par une augmentation relativement importante des pourcentages en acides gras insaturés tels que les acides oléiques, C18 : 1 (respectivement 16,4 % et 14,3 % pour les pollens W166K et T2U), linoléiques, C18 : 2 (10,2 % et 6,2 %), linoléniques, C18 : 3 (7,4 % et 4,1 %).



DES STYLES VIERGES ET XENOPOLLINISES

REPARTITION DES ACIDES GRAS DES GLYCOSPHINGOLIPIDES NEUTRES

BUS

FIGURE 11

Cette remarque générale demande à être nuancée notamment dans le cas de l'acide homogamma-linolénique (C20 : 3) et de l'acide béhénique (C20 : 0). En effet, ces deux acides gras ne peuvent pas être réellement séparés sur le type de colonne employé.

Ces réserves émises, il semble que la composition en acides gras des styles et des pollens s'éloigne au niveau du degré de saturation des acides gras lorsque la chaîne possède plus de 16 atomes de carbone.

 b) comparaison des compositions en acides gras des glycosphingolipides neutres des styles vierges et xénopollinisés (figure 11). Ces schémas montrent que la xénopollinisation se traduit par diverses variations.

Ainsi, après 8 heures de pollinisation, les variations correspondent :

- une diminution des acides gras dont la chaîne est inférieure à 18 atomes de carbone ;

- une augmentation en ce qui concerne les polyinsaturés (oléate, lincléate, lincléate, lincléate) et les acides gras à longue chaîne (acide arachidique).

Par contre, après 24 heures de pollinisation, le profil de leur composition en acides gras s'inverse très nettement :

- élévation des teneurs en acides gras à chaînes carbonées courtes saturées tels acide myristique (C14 : 0), pentadécanoique (C15 : 0), palmitique (C16 : 0), stéarique (C18 : 0) ou insaturées tels acide palmitoléique (C16 : 1), acide oléique (C18 : 1) ;

- baisse concomitante des acides gras polyinsaturés (linoléate et linolénate) et à longue chaîne (arachidate).

Deux exceptions doivent cependant être relevées : le comportement singulier du myristoléate et du groupe homogamma-linolénate et béhénate.

En résumé, la xénopollinisation est caractérisée par une diminution des taux d'acides gras courts et une augmentation du degré de désaturation puis, par le relèvement des teneurs en acides gras courts et la baisse concomitante des acides gras longs.







BIIS

FIGURE 13

# REPARTITION DES ACIDES GRAS DES GLYCOSPHINGOLIPIDES NEUTRES

DES STYLES AUTOPOLLINISES ET XENOPOLLINISES



## TABLEAU 15

TABLEAU RECAPITULATIF DE L'EVOLUTION DE LA REPARTITION DES ACIDES GRAS AU NIVEAU DES GLYCOSPHINGOLIPIDES NEUTRES TOTAUX

		C 14:0	C 14:1	C 15:0	с 16:0	С 16:1	C 17:0	C 18:0	C 18:1	C 18:2	C 18:3	C 20:0	C 22:0
a)	xéno- pollinisation					51							
b)	auto- pollinisation					1						1	
c)	comparaison entre + et x	≠	H	≠	≠		≠	7	≠	#	=	,	#
d)	situation après 8 heures	+≻x	+>×	+>x	<b>+</b> { X	+ <b>(</b> X	+) X	<b>∻</b> {×	-+ <b>〈</b> ×	+ 4 <sup>5</sup> .7	+>×	+ { 7	+>×
e)	situation après 24 heures	+<*	+{×	<b>+</b> -{.%	*<*	~ (X	+ { ×	+<*	+.<`*	+{*	+4 x	+> x	+> ×

La première flèche illustre le sens des variations pour la période 0-8 heures ; la seconde flèche les représente au cours de la période 8-24 heures.

Le sigle x correspond à la xénopollinisation le sigle + correspond à l'autopollinisation.

Lignes a, b : les cases hachurées témoignent de la différence de comportement entre auto et xénopollinisation.

Lignes d, e : les cases en pointillés traduisent une répartition préférentielle pour la xénopollinisation, les cases blanches une répartition préférentielle pour l'autopollinisation.

c) comparaison des compositions en acides gras des glycosphingolipides neu-

tres des styles vierges et autopollinisés (figure 12). La figure 12 réunit des résultats obtenus en comparant les chromatogrammes des extraits de styles vierges (W166K) et autopollinisés (W166K.W166K) ; la durée de la pollinisation varie de 8 à 24 heures.

Après 8 heures de pollinisation incompatible, le profil de la répartition des acides gras, par rapport à celui des styles vierges, accuse en règle générale :

- une baisse significative du taux des acides gras à chaîne courte et du degré de désaturation (baisse de l'oléate, linoléate) ;

- une augmentation également significative des acides gras à longue chaîne.

Ce phénomène est encore plus marqué après la 24ème heure de croisement incompatible. Il convient de souligner le comportement singulier de l'heptadécanoate et du linolénate. Ces deux acides gras ne suivent pas la règle générale.

d) comparaison des compositions en acides gras des glycosphingolipides neu-

tres après auto et xénopollinisation (figure 13). Enfin, par souci de synthèse, nous avons reporté figure 13 les résultats obtenus après 8 et 24 heures d'auto et de xénopollinisation. Il en ressort que les compositions en acides gras, des styles auto et xénopollinisés, sont très différentes voire même opposées.

Ces variations sont représentées dans le tableau 15.

- en a et b, les flèches représentent les sens de variations de la composition en acides gras observées lors de la xénopollinisation (a) ou de l'autopollinisation (b). La première flèche indique le sens de la variation du taux d'acides gras entre 0 heure (représentée par le style vierge W166K) et 8 heures ; la seconde, le sens de variation de ces taux entre 8 et 24 heures ;

- la ligne c résume l'évolution de la composition en acides gras sur l'ensemble des 24 heures ;

- les lignes d et e indiquent la teneur relative de chaque acide gras en fonction des pollinisations compatible et incompatible, l'une par rapport à l'autre. L'autopollinisation est représentée par le sigle +, la xénopollinisation par le sigle x.

Il apparaît qu'après 8 heures de croisement, la xénopollinisation comme l'autopollinisation entraîne, mises à part quelques divergences (3), une augmentation des acides gras à chaîne longue au détriment des acides gras courts (lignes a et b).



FIGURE 14

Cependant, l'étude comparative des teneurs de chaque acide gras en fonction de la pollinisation (lignes d et e) indique que ces variations ne se font pas avec la même intensité. Ainsi, l'autopollinisation semble en relation avec un métabolisme actif au niveau du myristoléate, palmitate, palmitoléate, stéarate, oléate, linolénate. Les modifications apportées par l'autopollinisation sont plus importantes et plus marquées que celles apportées par la xénopollinisation.

Après 24 heures de croisement, il y a opposition très nette entre les deux métabolismes qui accompagnent l'auto et la xénopollinisation.

La xénopollinisation inverse le profil de la répartition des acides gras, contrairement à l'autopollinisation qui est marquée par l'augmentation des teneurs en acides gras longs au détriment de celles des acides gras courts (lignes a, b et d).

 e) comparaison des variations de la composition en acides gras en fonction du génotype de la plante pollinisée. Afin d'envisager ces résultats dans un contexte plus large, nous avons également comparé les variations de la composition en acides gras en fonction du génotype de la plante pollinisée.

Nous avons donc analysé les styles provenants de plantes W166K et T2U soit : - pour les croisements incompatibles :

W166K.W166K	24	heures	de	croisement
Т2И.Т2И	24	heures	de	croisement

- pour les croisements compatibles :

W166K.T2U	24	heures	de	croisement
T2U.W166K	24	heures	de	croisement.

Les résultats obtenus sont rassemblés figure 14 . En ce qui concerne les acides gras à chaînes courtes, saturées ou insaturées et les acides gras à longues chaînes saturées, le profil de la répartition de ces acides gras en fonction du type de pollinisation est sensiblement identique quel que soit le génotype de la plante utilisée. Les divergences de comportement se situent au niveau des acides gras polyinsaturés à longue chaîne c'est-à-dire l'oléate, linoléate, linolénate et le groupe homogamma-linolénate-béhénate. Le fait que nous ne possédons pas de renseignements sur les compositions homologues des styles vierges (T2U) et sur les styles ayant subi 8 heures de pollinisation , ne nous permet pas de conclure avec précision à un phénomène métabolique général. Cependant, la même opposition entre autopollinisation et xénopollinisation se rencontre quel que soit le génotype de la plante considérée.

# 4 - Conclusions :

Au terme de cette étude il apparaît que le phénomène de pollinisation perturbe le métabolisme des glycosphingolipides. Il entraîne des modifications quantitatives, mais également qualitatives.

En effet, si la xénopollinisation correspond à une baisse lente mais régulière de la teneur en glycosphingolipides totaux, neutres et acides, l'autopollinisation accompagne un métabolisme plus varié caractérisé par l'effondrement de ces mêmes glycosphingolipides et qui est suivi d'une stabilisation, voire même d'une réaugmentation de leur taux. Cette diminution est intéressante à considérer car elle peut résulter :

- soit d'un arrêt momentané de la synthèse ;

- soit d'un catabolisme préférentiel et massif.

La première hypothèse rendrait compte de la diminution lente et régulière observée en xénopollinisation, mais n'expliquerait pas une diminution aussi nette après autopollinisation.

D'autre part, les premiers résultats concernant les modifications qualitatives des glycosphingolipides neutres au niveau de leur composition en acides gras, semblent indiquer que quelle que soit la pollinisation, le métabolisme lipidique est perturbé. Ces perturbations s'effectueraient en deux stades :

- le premier allant de 0 à 8 heures correspondrait à l'installation d'un nouveau métabolisme induit peut être par le pollen (élévation du taux des acides gras polyinsaturés). Pendant cette période, les réponses incompatibles et compatibles sont définies mais elles ne s'expriment que très peu (variation du degré de saturation des acides gras, teneur différente); - le second allant de 8 à 24 heures correspondrait à l'expression des deux types de réponses ; la xénopollinisation se caractérisant par un métabolisme différent, l'autopollinisation par un blocage et une accentuation du métabolisme induit dans la première période.

Cependant, même si ces suggestions sont séduisantes, il nous a semblé important de mieux définir la participation métabolique des glycosphingolipides neutres dans chacune des diverses classes.

# CHAPITRE V

Isolement et	évolutions des divers glycosphingolipides neutres	63
I - Fraction	nement des glycosphingolipides neutres	63
1 -	Chromatographie d'adsorption sur colonne d'acide silici- que	63
2 -	Chromatographie préparative en couche mince	65
II – Analyse	quantitative des glycosphingolipides neutres	66
1 -	Comparaison de la répartition des diverses classes de glycosphingolipides neutres dans les styles vierges et dans les pollens	66
2 -	Comparaison de la répartition des diverses classes de glycosphingolipides neutres des styles pollinisés (compatibles et incompatibles)	67
3 -	Conclusion	69
	Isolement et I - Fraction 1 - 2 - II - Analyse 1 - 2 - 3 -	<ul> <li>Isolement et évolutions des divers glycosphingolipides neutres</li> <li>I - Fractionnement des glycosphingolipides neutres</li></ul>

\_00\_00\_00\_00\_

# CHAPITRE V

# - ISOLEMENT ET EVOLUTION DES DIVERS GLYCOSPHINGOLIPIDES NEUTRES -

C'est dans le but de mieux définir les perturbations métaboliques nées de la pollinisation et plus particulièrement de l'autopollinisation, que nous avons entrepris l'étude de chaque classe de glycosphingolipides neutres.

Dans un premier temps nous avons fractionné les glycosphingolipides en fonction du nombre de résidus osidiques contenu dans chaque molécule. Puis nous avons étudié la répartition quantitative des divers lipides obtenus, **ainsi que** ses modifications provoquées par les deux types de réactions compatible ou incompatible.

Enfin, nous nous sommes attachés à définir la composition en acides gras, bases à longue chaîne et en oses de chacune des fractions.

### I - FRACTIONNEMENT DES GLYCOSPHINGOLIPIDES NEUTRES

1 - Chromatographie d'adsorption sur colonne d'acide silicique : Nous avons donc fractionné les glycosphingolipides neutres par chromatographie d'adsorption sur colonne d'acide silicique (fiche technique n° 4). Les glycosphingolipides sont élués selon leur polarité, c'est-à-dire en fonction du nombre de résidus osidiques contenus dans la molécule.

Plusieurs techniques proposées (ROUSER, 1967) ont été testées, elles correspondent aux mélanges chloroforme-méthanol ou chloroforme-acétone.

ANALYSE PAR CHROMATOGRAPHIE EN COUCHE MINCE DES FRACTIONS F1, F2, F3, F4 ET F5 SEPAREES SUR COLONNE D'ACIDE SILICIQUE



Plaque de gel de silice G activée 1 heure à 120°C solvant :  $CHCl_3 - CH_3OH - H_2O$  (65 : 25 : 4, v/v/v) migration : 13 cm révélation : réactif à la Rhodamine 6G réactif à l'a-naphtol Aucune combinaison ne nous a permis de séparer de façon parfaite tous les glycosphingolipides car, si la séparation des lipides les moins polaires tels que céramides, monoglycosyl-céramides ou diglycosyl-céramides est aisée, celle des glycosphingolipides très polaires sera difficile. Aussi, tenant compte des observations de KARLSSON (1973) qui a démontré que les zones d'élution étroites pour les lipides apolaires, s'élargissent ensuite de plus en plus, d'où les "chevauchements" constatés d'une phase sur l'autre, nous avons donc opté pour le schéma d'élution suivant et présenté figure 15, bien qu'il ne soit pas totalement efficace :

-	fraction	1	:	CHC13-	-СН <sub>З</sub> ОН	dans	les	proportions	98/2, v/v
-	fraction	2	:	11	'n	11	11	**	92/8, v/v
-	fraction	3	:	11	tt - 1	11	11	· 11 *	85/15, v/v
-	fraction	4	:	11	11	11	11	**	45/55, v/v
-	fraction	5	:	**	11	11	11	11	0/100, v/v

L'identification des fractions a été réalisée par chromatographie en couche mince (figure 15 ) dans le solvant  $CHCl_3-CH_3OH-H_2O$  dans les proportions 65-25-4 (v/v/v) et par emploi de réactifs de détection spécifique de la partie osidique des glycosphingolipides.

- la fraction F1 correspond principalement aux céramides (Cer). Il est cependant possible de détecter des traces de monoglycosyl-céramides (MGCer) α-naphtol positifs.

- la fraction F2 est composée de monoglycosyl-céramides (MGCer) et de diglycosyl-céramides (DGCer).

- la fraction F3 correspond principalement aux diglycosyl-céramides (DGCer), cependant ils sont contaminés par des traces de monoglycosyl-céramides et de triglycosyl-céramides (TGCer).

- la fraction F4 contient en majeure partie des triglycosyl-céramides (TGCer) et des tétraglycosyl-céramides (TrGCer).

- la fraction F5 renferme, outre des tri et tétraglycosyl-céramides, des lipides très polaires non identifiés. Ainsi, force est de constater que même ce protocole est imparfait, le fractionnement des glycosphingolipides neutres en classes se heurte à des problèmes qui relèvent :

- des chevauchements de polarité d'où un fractionnement incomplet ne conduisant jamais à un glycosphingolipide très pur ;

- de la présence de pigments ou de contaminants. En effet, après le fractionnement sur DEAE-Cellulose, les glycosphingolipides neutres sont encore contaminés par des traces de pigments chlorophylliens ou caroténoides dénaturés par les conditions d'hydrolyse alcaline et qui sont élués progressivement en fonction de la polarité du solvant éluant.

Il est donc nécessaire de procéder à une étape supplémentaire de purification. En raison des faibles quantités de lipides dont nous disposons, nous avons choisi une étape de chromatographie préparative en couche mince.

### 2 - Chromatographie préparative en couche mince :

Les fractions correspondant aux divers glycosphingolipides neutres sont évaporées et reprises dans un petit volume de  $CH_3OH-CHCl_3$  (1 : 2, v/v), puis déposées dans leur totalité sur des plaques de gel de silice G activées 30 minutes à 120°C.

La séparation chromatographique est assurée par le mélange solvant  $CHCl_3-CH_3OH_2O$  (65 : 25 : 4, v/v/v). Après révélation à la Rhodamine 6G (qui respecte la structure des acides gras) et lecture des plaques en UV, les spots des divers glycosphingolipides (Cer, MGCer, DGCer, TGCer et TrGCer) sont élués quantitativement (fiche technique n° 7).

La pureté de chaque classe de lipides est testée par chromatographie analytique en couche mince (fiche technique n° 6).

Nous nous sommes volontairement limités aux 5 glycosphingolipides neutres cités soit Cer, MGCer, DGCer, TGCer et TrGCer pour des raisons techniques. En effet, la séparation des glycosphingolipides sur couche mince dans le système solvant, que nous avons employé, dépend étroitement du nombre de résidus osidiques, les céramides migrant le plus rapidement et les lipides polaires restant au point de départ. Plus le nombre de résidus osidiques augmente, plus les

# TABLEAU 16

# DISTRIBUTION DES TENEURS EN GLYCOSPHINGOLIPIDES NEUTRES

# DANS LES SOUS-FRACTIONS 1, 2, 3, 4 et 5.

Matériel analysé	1		2		3		, 4		5	
	n.moles par g. de tissi	%	n.mole par g. de tîssi	%	n.moles par g. de tissu	%	n.moles par g. de tissu	%	n.moles par g. de tissu	%
Styles vierges WI66K	227,7	48,14	180,1	38,05	27,4	5,78	19,4	4,10	18,50	3,91
Pollen WI66K	185,4	30,33	200,7	32,84	89,6	14,66	77,9	12,75	57,5	9,41
Pollen T2U	158,2	30,87	215,2	41,98	50,9	9,93	54,1	10,55	34,2	6,66
Styles autopollinisés 8h Wi66K x WI66K	114,6	37,88	108,1	35,64	29,9	9,89	24,1	7,04	26,2	8,63
Styles xénopollinisés 8h WI66K x T2U	206,1	41,92	176,5	35,89	54,6	11,10	34,5	7,01	19,9	4,05
Styles autopollinisés 24h WI66K x WI66K	128,8	32,72	186,4	47,35	34, <b>2</b>	8,68	25,6	6,51	18,6	4,73
Styles xénopollinisés 24h WI66K x T2U	97,8	20,26	284,9	59,10	46,3	9,60	32,7	6,80	20,3	4,22
Styles autopollinisés 24h T2U x T2U	180,8	29,63	263,1	43,12	67,1	10,99	48,5	7,95	50,6	8,29
Styles xénopollinisés 24h T2U	223,1	29,16	347,9	45,47	62,1	8,12	73,7	9,64	58,2	7,60



COMPARAISON DE LA DISTRIBUTION DES TENEURS EN GLYCOSPHINGOLIPIDES

NEUTRES DANS LES SOUS-FRACTIONS 1,2,3,4,5.



rf sont petits et voisins les uns des autres. Au-dessus de 5 unités monosaccharidiques, la séparation des glycosphingolipides et leur identification sont pratiquement impossibles. Nous abordons ici la limite de la technique, aussi ces difficultés d'identification précise et de purification nous conduisent à limiter nos études à celles des glycosphingolipides ne possédant pas plus de 4 unités monosaccharidiques.

### II - ANALYSE QUANTITATIVE DES GLYCOSPHINGOLIPIDES NEUTRES

L'analyse quantitative des divers glycosphingolipides neutres a été réalisée selon la technique fluorimétrique de NAOI (1974) (fiche technique n° 9). Les résultats obtenus sont reportés tableau 16 . Nous avons envisagé la répartition des diverses classes de glycosphingolipides neutres dans les pollens, styles vierges auto et xénopollinisés.

## 1 - Comparaison de la répartition des diverses classes de glycosphingolipides neutres dans les styles vierges et dans les pollens :

L'analyse de la répartition des divers glycosphingolipides neutres des styles vierges W166K met en évidence la prépondérance des deux premières fractions (48 % de céramides, fraction F1 ; 38 % environ de monoglycosyl-céramides, fraction F2) par rapport aux autres fractions éluées (F3, F4 et F5),(figure 16).

Cette prépondérance des fractions 1 et 2 par rapport aux fractions 3, 4 et 5 est générale, et se retrouve au niveau des styles et des pollens. Cependant, pour les pollens, quel que soit leur génotype, il convient de souligner l'importance relative de la distribution des 3 dernières fractions. Les teneurs en di, tri et tétraglycosyl-céramides des fractions F3, F4 et F5 sont de 1,5 à 3 fois plus élevées que celles relevées dans les styles vierges.
CINETIQUE DU METABOLISME DES GLYCOSPHINGOLIPIDES NEUTRES DANS LES

FRACTIONS 1, 2, 3, 4, 5,



 2 - Comparaison de la répartition des diverses classes de glycosphingolipides neutres des styles pollinisés (compatibles et incompatibles) :

a) <u>styles xénopollinisés</u>. La comparaison des résultats des styles xénopollinisés, par rapport à ceux des styles vierges, met en évidence par leur divergence en fonction du temps, deux comportements :

- celui des céramides et monoglycosyl-céramides (fractions F1 et F2) ; - celui des di, tri et tétraglycosyl-céramides (fractions F3, F4 et F5).

Ainsi, le comportement des céramides et monoglycosyl-céramides s'individualise dans le premier temps de la xénopollinisation, par une légère diminution de leurs teneurs qui se poursuit dans le second temps (8 à 24 heures) pour les céramides, cependant que le taux des monoglycosyl-céramides va s'élever.

La xénopollinisation entraîne des modifications significatives des concentrations relatives des glycosphingolipides neutres du deuxième groupe di, tri et tétraglycosyl-céramides. En effet, après 8 heures de xénopollinisation, une augmentation significative de leurs teneurs respectives est constatée suivie dans le deuxième temps de 8 à 24 heures d'une diminution des teneurs des fractions F3 et F4 et d'une légère hausse des taux de la fraction F5.

Ces variations en fonction du temps peuvent être mieux comprises dans des cinétiques établies (tableau 17 ). Nous avons essayé de l'interpréter. La diminution lente mais constante des teneurs des céramides et des monoglycosylcéramides, au cours de la xénopollinisation de 0 à 8 heures, est relativement compensée par l'augmentation des glycosphingolipides neutres des fractions F3, F4 et F5. On peut donc émettre l'hypothèse que les céramides et peut être les monoglycosyl-céramides se comportent comme des précurseurs métaboliques des glycosphingolipides plus polaires.

La disparition progressive de la fraction F1, et partiellement de la fraction F2, pourrait résulter :

- d'une impossibilité de leur synthèse par déficience enzymatique ;
- ou encore d'une activation du processus de leur dégradation ;
- enfin d'une déviation par exemple vers une voie métabolique où la synthèse des glycosphingolipides intéresserait une séquence osidique plus longue.

COMPARAISON DE LA DISTRIBUTION DES TENEURS EN GLYCOSPHINGOLIPIDES NEUTRES DANS LES SOUS-FRACTIONS 1,2,3,4,5.



COMPARAISON DE LA DISTRIBUTION DES TENEURS EN GLYCOSPHINGOLIPIDES NEUTRES DANS LES SOUS-FRACTIONS 1,2,3,4,5.



COMPARAISON DE LA DISTRIBUTION DES TENEURS EN GLYCOSPHINGOLIPIDES NEUTRES DANS LES SOUS-FRACTIONS 1,2,3,4,5.



 Bils
 W166K W166K 8h
 W166K W166K 24h

 W166K T2U 8h
 W166K T2U 24h

En ce qui concerne la variation des teneurs en di, tri et tétraglycosyl-céramides, deux hypothèses peuvent être envisagées ;

- un arrêt de leur "turn over" et de leur catabolisme ;

- une augmentation de leur synthèse.

Ainsi, il est possible que dans un premier temps (entre 0 et 8 heures), les Cer et les MGCer soient préférentiellement dirigés vers divers métabolismes et en particulier vers la synthèse de DGCer, TGCer et TrGCer. Dans un second temps (8 - 24 heures) les céramides pourraient être engagés vers la synthèse de MGCer.

b) <u>styles autopollinisés</u>. L'autopollinisation permet d'envisager ici aussi deux types de comportement celui :

- des céramides (F1) et des MGCer (F2) ;

- des di, tri et tétraglycosylcéramides des fractions F3, F4 et F5.

Cependant, si les profils sont identiques (figure 17) aux profils apportés par la xénopollinisation (figures 18 et 19) l'intensité de leurs variations est différente.

c) <u>comparaison entre auto et xénopollinisation</u>. Le fait que leurs évolutions soient parallèles mais d'intensités différentes (à l'exception de l'évolution des lipides très polaires qui caractérisent la fraction F5, le comportement des glycosphingolipides semble un tràit général et très spécifique de la pollinisation. Cependant, il convient de souligner le fait qu'en xénopollinisation les augmentations sont toujours plus importantes et qu'en autopollinisation les diminutions toujours plus accusées.

Il est ainsi tentant d'en déduire que les perturbations métaboliques sont, en autopollinisation, plus orientées vers le catabolisme et/ou le défaut de synthèse.

Au contraire, les variations métaboliques dans le cas de la xénopollinisation, sont dirigées principalement vers un accroissement de la synthèse de glycosphingolipides riches en unités monosaccharidiques.

COMPARAISON DE LA DISTRIBUTION DES TENEURS EN GLYCOSPHINGOLIPIDES NEUTRES DANS LES SOUS-FRACTIONS 1,2,3,4,5.





Par conséquent, après 24 heures de croisement, les styles xénopollinisés sont toujours plus riches en glycosphingolipides que les styles autopollinisés, et ce quel que soit le type de glycosphingolipide considéré.

d) <u>influence du génotype</u>. Les résultats obtenus au niveau de différents croisements compatibles (plante W166K pollinisée par le pollen T2U, plante T2U pollinisée par le pollen W166K) et incompatibles (plante W166K pollinisée par le pollen W166K et plante T2U pollinisée par son propre pollen T2U) sont envisagés afin de mieux connaître la répartition des glycosphingolipides neutres en fonction du génotype des plantes xénopollinisées et autopollinisées.

Ces résultats sont également exprimés en fonction de ceux des styles vierges (figure 20 ). Mise à part la fraction F3, les profils de distribution sont identiques quel que soit le génotype étudié. Il convient cependant de souligner les différences de teneurs en glycosphingolipides entre les différents génotypes.

## 3 - Conclusion :

1 - Les céramides et les monoglycosylcéramides des fractions F1 et F2 représentent à eux seuls entre 63 et 86 % des glycosphingolipides neutres totaux. On peut donc penser que la diminution de leurs teneurs observée après pollinisation, doit être responsable de la baisse des valeurs observée au niveau des glycosphingolipides totaux et des glycosphingolipides neutres totaux, notamment dans le cas de croisements incompatibles.

2 - Après xénopollinisation et autopollinisation, les lipides peuvent être divisés en deux groupes bien distincts selon leur comportement :

> - les Cer - MGCer ; - les DGCer - TGCer et TrGCer

Le premier groupe est caractérisé par une chute de la teneur en lipides après 8 heures de pollinisation, le second par une augmentation. Après 24 heures de pollinisation, les variations les plus intéressantes concernent Cer et MGCer dont les valeurs diminuent et augmentent respectivement. Seules les amplitudes des variations relevées caractérisent les pollinisations compatibles et incompatibles.

Les fortes teneurs des fractions polliniques F3, F4 et F5 ne peuvent expliquer l'augmentation de ces mêmes fractions dans les styles pollinisés. Une telle hypothèse ne pourrait s'appliquer qu'à la xénopollinisation, mais pas à l'autopollinisation. En effet, l'autopollinisation semble plutôt caractérisée par l'absence ou l'inhibition d'un système de synthèse ou une prépondérance de systèmes catalytiques. Les céramides et monoglycosylcéramides pourraient toutefois servir de précurseurs métaboliques et être impliqués indirectement dans des synthèses de type lipidique ou non.

Afin de mieux cerner les hypothèses de ces interrelations entre céramides, monoglycosylcéramides et les di, tri et tétraglycosylcéramides, nous avons entrepris de définir la composition en acides gras, bases à longues chaînes et oses des glycosphingolipides purifiés après chromatographie préparative en couche mince.

## CHAPITRE VI

•	Analyse des constituants des glycosphingolipides neutres	
	Introduction	71
	Aspects analytiques	72
	I - Extraction des acides gras et composition en acides gras	72
	II - Extraction des bases à longue chaîne (LCB) et composition	72
	1 – Obtention des bases à longue chaîne	72
	2 - Obtention de dérivés dinitrophénylés	72
	3 – Analyse des bases	73
	4 - Analyse de la copule osidique	74
	Variations de la composition en acides gras	74
	I - Répartition des acides gras dans les pollens et les styles vierges	75
	II - Evolution du degré de saturation en fonction du type de pollinisation	75
	1 - Influence de la xénopollinisation	76
	2 - Influence de l'autopollinisation	76
	3 - Influence du génotype	77
	III - Variations du rapport : taux des acides gras à nombre impair d'atomes de carbone / taux des acides gras à nombre pair (I/P)	78
	1 - Variations du rapport I/P	78
	2 - Variations du rapport IS/PS	79
	3 - Variations du rapport II/PI	79
	4 - Variations des rapports I/P, IS/PS et II/PI en fonction du génotype	79
	5 - Conclusion	80

IV - Evolution de la répartition des acides aras courts en C10.	
C11, C12 et C13	80
1 - Influence de la durée et du tupe de pollinisation	80
2 - Influence du génotupe	87
	01
V - Evolution de la répartition des acides gras à chaîne mouenne	
en C14, C15, C16 et C17	81
1 - Influence de la durée et du type de pollinisation	82
2 - Influence du génotype	82
VI - Evolution de la répartition des acides gras en C18 saturés	
ou insaturés	83
1 - Influence de la durée et du type de pollinisation	83
2 – Influence du génotype	83
VII - Evolution de la répartition des acides gras longs en C20,	~ ~
C22, C23 et C24	84
1 - Influence de la durée et du type de pollinisation	84
2 - Influence du génotype	84
VIII - Conclusion	85
Composition en bases à longue chaîne	86
	00
1 – Extraction des bases à longue chaîne et transformation en dérivés dinitrophénulés	86
2 - Analyse des DNP-dérivés des bases (KARLSSON, MARTENSON).	87
I - Bases à longue chaîne et céramides	89
1 - Companyaison das compositions on hassa à longue chaîne	
des pollens et des styles vierges	89
2 - Pollinisations et bases à longue chaîne	90
3 - Distribution en fonction du génotype	91

II - Bases à longue chaîne et monoglycosylcéramides	92
1 – Distribution en fonction du temps et du mode de pollinisation	92
2 - Distribution en fonction du génotype	93
III - Bases à longue chaîne et diglycosylcéromides	.94
1 - Distribution au niveau des pollens et des styles	9.4
2 - Distribution en fonction du temps et du mode de pollinisation	94
3 - Distribution en fonction du génotype	95
IV - Bases à longue chaîne et triglycosylcéramides	95
1 – Distribution au niveau des pollens et des styles	96
2 - Distribution en fonction du temps et du mode de pollinisation	96 .
3 - Distribution en fonction du génotype	97
V - Bases à longue chaîne et tétraglycosylcéramides	97
1 - Identification	97
2 - Distribution au niveau des pollens et des styles vierges.	98
3 - Distribution en fonction du temps et du mode de pollinisation	98
VI - Conclusion	99
	•
Caractérisation de la copule osidique	101
I - Extraction et identification des constituants de la copule osidique	101
II – Résultats de l'analyse	101
1 - Copule osidique des monoglycosylcéramides	102
2 - Copule osidique des diglycosylcéramides	102
3 - Copule osidique des tri et tétraglycosylcéramides	105

III	-	Cond	eli	usion	•••	•••	•••	•••	•••	•••	•••		•••	•••	•••	•••	•••	•••	•••	•••	•••	•••	•••	•••	•••	• •	•••	•••	105
		1	-	Мопод	ly	00	syl	cé	ra	mi	les	3.																	105
		2	-	Dialu	co	sui	lcé	ira	mi	des	3.																		106

\_00\_00\_00\_00\_

## CHAPITRE VI

## - ANALYSE DES CONSTITUANTS DES GLYCOSPHINGOLIPIDES NEUTRES -

## INTRODUCTION

L'identification des constituants des différentes classes de glycosphingolipides neutres (Céramides, Mono, di, tri et tétraglycosylcéramides) précédemment purifiées par chromatographie préparative en couche mince, suppose la séparation préalable des acides gras et de la base à longue chaîne par rupture de la liaison amide.

Or, cette liaison étant très résistante, sa rupture ne peut être effective que par hydrolyse. Nous avons donc recherché une méthode d'hydrolyse satisfaisante c'est-à-dire capable de rompre cette liaison en respectant la configuration des bases. C'est ainsi que la méthanolyse acide en milieu anhydre est une technique hydrolytique souvent proposée mais que nous n'avons pas retenue, car l'hydrolyse est insuffisante et conduit à des artéfacts à partir des bases à longue chaîne (la 3-0-méthyl sphingosine, la 5-0-méthyl A3 sphingosine ; GAVER-SWEELEY, 1965). Aussi avons-nous rompu la liaison amide par une technique susceptible de respecter davantage les structures c'est-à-dire par une hydrolyse acide (solution méthanol chlorhydrique, HCl 1N dans  $CH_3OH +$ 10 molécules d'H<sub>2</sub>O) pendant 23 heures, sous atmosphère d'azote (fiche technique n° 10).

## ASPECTS ANALYTIQUES

## I - EXTRACTION DES ACIDES GRAS ET COMPOSITION EN ACIDES GRAS

L'hydrolysat subit une première extraction par le n-hexane. La phase hexanique contient les acides gras, tandis que les oses et les bases à longue chaîne restent dans la phase méthanolique acide. Cette phase est très rapidement neutralisée par addition d'acétate d'argent. Une partie aliquote servira à la détermination de la composition en glucides et l'autre à celle de la composition en bases à longue chaîne.

Les acides gras extraits par le n-hexane sont ensuite transestérifiés comme précédemment et purifiés par chromatographie en couche mince.

L'étude de la composition en acides gras est également réalisée par chromatographie en phase gazeuse sur un appareil Varian 1800 équipé d'un détecteur à ionisation de flamme. La colonne de type standard est remplie de DEGS à 10 % sur chromosorb W 60/80 mesh AW dont nous donnons les caractéristiques fiche technique n° 12.

## II - EXTRACTION DES BASES A LONGUE CHAINE (LCB)ET COMPOSITION

Les bases à longue chaîne libres sont particulièrement instables, il convient de procéder à leur extraction et à leur transformation en dérivés dinitrophénylés le plus rapidement possible.

## 1 - Obtention des bases à longue chaîne :

Les bases (LCB) sont extraites sélectivement par le diéthyléther en milieu alcalin, ce qui rend impossible toutes analyses de la partie osidique sur la phase inférieure (fiche technique n° 13).

## 2 - Obtention de dérivés dinitrophénylés :

Les bases (LCB) sont donc ensuite transformées en DNP-dérivés stables par le 1-fluoro-2,4-dinitro-benzène selon le protocole de KARLSSON, 1970 (fiche technique n° 13). Les DNF-dérivés sont ensuite purifiés par une étape chromatographique en couche mince (fiche technique n° 13) afin d'éliminer excès de réactifs et impuretés.

## 72

## 3 - Analyse des bases :

Leur analyse sera complexe parce qu'elle implique plusieurs étapes qui succèdent à celle de la stabilisation par dinitrophénylation.

a) <u>analyse des bases sous forme d'aldéhydes</u>. La transformation des bases en aldéhydes est réalisée par oxydation au tétra-acétate de plomb (fiche technique n° 13). Au cours de l'oxydation, les bases tri-hydroxylées perdent 3 atomes de carbone, tandis que les bases di-hydroxylées n'en perdent que 2. Les aldéhydes ainsi obtenus auront donc une chaîne plus courte.

L'étude des aldéhydes peut être envisagée par chromatographie en couche mince ou en phase gazeuse. C'est cette dernière méthode que nous avons retenue afin d'identifier et de doser les aldéhydes. Elle est réalisée sur colonne de DEGS à 10 % sur chromosorb W 60/80 mesh AW (fiche technique n° 13).

L'identification des aldéhydes pose un délicat problème technique car l'obtention de résultats fiables exige le couplage de plusieurs méthodes analytiques. En particulier, l'analyse par chromatographie en phase gazeuse impose la transformation des aldéhydes en produits volatiles plus stables. Pour des raisons d'appareillage (identité des colonnes) nous avons opté pour la transformation des aldéhydes à longue chaîne en acides gras homologues.

b) <u>analyse des bases sous forme d'acides gras</u>. La transformation des aldéhydes en acides gras homologues constituera la seconde étape. Elle est réalisée par oxydation par le permanganate de potassium (fiche technique n° 13). Cette oxydation peut avoir lieu directement sur le mélange d'aldéhydes saturés ou insaturés, soit après hydrogénation catalytique. En effet, l'oxydation par le permanganate détruit partiellement les aldéhydes désaturés.

Le but essentiel de cette analyse étant l'identification des aldéhydes, nous avons retenu l'oxydation par le permanganate sans hydrogénation catalytique préalable.

Les acides gras ainsi obtenus sont transestérifiés par le mélange méthanolacide sulfurique. Après purification par chromatographie en couche mince, ils sont analysés par chromatographie en phase gazeuse sur colonne de DEGS à 10 % sur chromosorb W (fiche technique n° 12).



TABLEAU 18

## REPARTITION DES ACIDES GRAS AU NIVEAU DES CERAMIDES

Pollen T2U	0,19 0,25	0,15 0,29	2,28 0,33	0,31 0,75	0,41	0,40	12,13	0,88 0,43	9,75 16,56	2,99	1,84 3,58	32,35 2,87	1,91 2,25	2.06	99,99
Pollen WI 66K	0,93 6,29	0,27	8,16 0.82	0,64 1,00	0,36	0,71	8,28	0,58 0,63	7,13	2,07 0,67	1,06	22,06	1,63	2,61 3,22	66*66
72U.19166K 24 hewres	0,21 0,22	0,30	2,35 0,59	0,49 0,65	0,66 C,63	0,69 0,77	9,55	0,89	7,38	3,82	3,65	18,54 9,74	3,20 2,84	2,05 8,73	72,99
72U.T2U 24 heures	0,50	0,31 0,73	2,29 0,94	0,81	2,53	1,02	12,93	0,76	8,79 7,79	2,05	2,22 1,60	28,12	2,12	3,32	99,98
w 56K.T2U 24 heures	c,04 0,29	0,24 0,35	1,12	0,66	1,55	1,36 1,66	9,92 2,62	1,82	9,36	3,93	1.13	17,27 5,35	3,29 3,91	4.71 3,86	99,99
21 66K.W166K 24 heines	0,24 0,24	0,42 0,77	2,33 0,85	0,80	1,66	1,05 0,92	19,21 2,29	1,06 0,81	7,27	3,55	1,13	19.43 4,26	3,47 1,48	4,30 3,44	40,99
wi 66KLT2U 8 heures	0,03 0,03	0,10	1,22	0,39 0,56	0,93 0,66	0,95	14,10	0,63 0,50	6,11	4,38 2,73	2,11 0,93	11,55 8,87	2,74 5,70	7,61 11,42	99,98
w166.w165K 8 hcures	0,29 0,65	0,19 0,33	1,45	0,75	c,85 1,81	0,74 0,62	7,11	0,17 0,38	4,68	4,00 3,21	2,15	21,41 8,21	2,72	5,93 14,88	99,98
Styles vienges W166K	0,17	0,20 0,12	6,65 2,00	1,57	0.82 0,25	3,55 0,46	17, <sup>1;5</sup> 3.69	0,56	9,04 19,18	8,35 3,74	1,41 6,97	9,79 2,68	1,30 0,45	2,60 2,03	26*66
croidsment formule cualities he shortland	C10 : 0 C10 : 1	- 0 - :: - :: - ::	C12 : 0 C12 : 1	C13 : 0 C13 : 1	C14 : 0 C14 : 1	C15 : 0 C15 : 1	c16 : 0 c16 : 1	C17 : 0 C17 : 1	C18 : : 0	C18 : 2 C18 : 3	c20 : 0 c20 :	0 C25 : - 0 C25	C23 : 0 C23 : 1	c24 : 0 c24 : 1	TOTAL

TOTAL	$\begin{array}{cccccccccccccccccccccccccccccccccccc$	croisement
୧୧,୧୧	Pas dose	Styles vierges Wi66K
99,99	Page 100 2,13 0,13 0,13 0,13 0,13 0,13 0,13 0,13 0,13 0,13 0,13 0,13 0,13 0,13 0,13 0,13 0,13 0,13 0,13 0,13 0,13 0,13 0,13 0,13 0,13 0,13 0,13 0,13 0,13 0,13 0,13 0,13 0,13 0,13 0,13 0,13 0,13 0,13 0,13 0,13 0,13 0,13 0,13 0,13 0,13 0,13 0,13 0,13 0,13 0,13 0,13 0,13 0,13 0,13 0,13 0,13 0,13 0,13 0,13 0,13 0,13 0,13 0,13 0,13 0,13 0,13 0,13 0,13 0,13 0,13 0,13 0,13 0,13 0,13 0,13 0,13 0,13 0,13 0,13 0,13 0,13 0,13 0,13 0,13 0,13 0,13 0,13 0,13 0,13 0,13 0,13 0,13 0,13 0,13 0,13 0,13 0,13 0,13 0,13 0,13 0,13 0,13 0,13 0,13 0,13 0,13 0,13 0,13 0,13 0,13 0,13 0,13 0,13 0,13 0,13 0,13 0,13 0,13 0,13 0,13 0,13 0,13 0,13 0,13 0,13 0,13 0,13 0,13 0,13 0,13 0,13 0,13 0,13 0,13 0,13 0,13 0,13 0,14 1,72 1,75 0,16 0,177 0,16 0,177 0,16 0,177 0,16 0,177 0,16 0,177 0,16 0,177 0,16 0,177 0,177 0,16 0,177 0,177 0,177 0,177 0,177 0,177 0,177 0,177 0,177 0,177 0,177 0,177 0,177 0,177 0,177 0,177 0,177 0,177 0,177 0,177 0,177 0,177 0,177 0,177 0,177 0,177 0,177 0,177 0,177 0,177 0,177 0,177 0,177 0,177 0,177 0,177 0,177 0,177 0,177 0,177 0,177 0,177 0,177 0,177 0,177 0,177 0,177 0,177 0,177 0,177 0,177 0,177 0,177 0,177 0,177 0,177 0,177 0,177 0,177 0,177 0,177 0,177 0,177 0,177 0,177 0,177 0,177 0,177 0,177 0,177 0,177 0,177 0,177 0,177 0,177 0,177 0,177 0,177 0,177 0,177 0,177 0,177 0,177 0,177 0,177 0,177 0,177 0,177 0,177 0,177 0,177 0,177 0,177 0,177 0,177 0,177 0,177 0,177 0,177 0,177 0,177 0,177 0,177 0,177 0,177 0,177 0,177 0,177 0,177 0,177 0,177 0,177 0,177 0,177 0,177 0,177 0,177 0,177 0,177 0,177 0,177 0,177 0,177 0,177 0,177 0,177 0,177 0,177 0,177 0,177 0,177 0,177 0,177 0,177 0,177 0,177 0,177 0,177 0,177 0,177 0,177 0,177 0,177 0,177 0,177 0,177 0,177 0,177 0,177 0,177 0,177 0,177 0,177 0,177 0,177 0,177	W155K.W166K 8 heures
66°66	<b>pas</b> 4056	W166K.TZU 8 'acutes
66'66	p         0,22           1,25         0,22           2,25         0,22           2,25         0,22           1,25         2,25           2,25         0,22           1,25         2,25           2,25         0,22           2,25         2,25           1,25         2,25           2,25         2,25           2,25         2,25           2,25         2,25           2,25         2,25           2,25         2,25           2,25         2,25           2,25         2,25           2,25         2,25           2,25         2,25           2,25         2,25           2,25         2,25           2,25         2,25           2,25         2,25           2,25         2,25           2,25         2,25           2,25         2,25           2,25         2,25           2,25         2,25           2,25         2,25           2,25         2,25           2,25         2,25           2,25         2,25           2,25	W166K.W156K 24 houres
96*66	0,02 0,02 0,02 0,02 0,02 0,02 0,02 0,02 0,02 0,02 0,02 0,02 0,02 0,02 0,02 0,02 0,02 0,02 0,02 0,02 0,02 0,02 0,02 0,02 0,02 0,02 0,02 0,02 0,02 0,02 0,02 0,02 0,02 0,02 0,02 0,02 0,02 0,02 0,02 0,02 0,02 0,02 0,02 0,02 0,02 0,02 0,02 0,02 0,02 0,02 0,02 0,02 0,02 0,02 0,02 0,02 0,02 0,02 0,02 0,02 0,02 0,02 0,02 0,02 0,02 0,02 0,02 0,02 0,02 0,02 0,02 0,02 0,02 0,02 0,02 0,02 0,02 0,02 0,02 0,02 0,02 0,02 0,02 0,02 0,02 0,02 0,02 0,02 0,02 0,02 0,02 0,02 0,02 0,02 0,02 0,02 0,02 0,02 0,02 0,02 0,02 0,02 0,02 0,02 0,02 0,02 0,02 0,02 0,02 0,02 0,02 0,02 0,02 0,02 0,02 0,02 0,02 0,02 0,02 0,02 0,02 0,02 0,02 0,02 0,02 0,02 0,02 0,02 0,02 0,02 0,02 0,02 0,02 0,02 0,02 0,02 0,02 0,02 0,02 0,02 0,02 0,02 0,02 0,02 0,02 0,02 0,02 0,02 0,02 0,02 0,02 0,02 0,02 0,02 0,02 0,02 0,02 0,02 0,02 0,02 0,02 0,02 0,02 0,02 0,02 0,02 0,02 0,02 0,02 0,02 0,02 0,02 0,02 0,02 0,02 0,02 0,02 0,02 0,02 0,02 0,02 0,02 0,02 0,02 0,02 0,02 0,02 0,02 0,02 0,02 0,02 0,02 0,02 0,02 0,02 0,02 0,02 0,02 0,02 0,02 0,02 0,02 0,02 0,02 0,02 0,02 0,02 0,02 0,02 0,02 0,02 0,02 0,02 0,02 0,02 0,02 0,02 0,02 0,02 0,02 0,02 0,02 0,02 0,02 0,02 0,02 0,02 0,02 0,02 0,02 0,02 0,02 0,02 0,02 0,02 0,02 0,02 0,02 0,02 0,02 0,02 0,02 0,02 0,02 0,02 0,02 0,02 0,02 0,02 0,02 0,02 0,02 0,02 0,02 0,02 0,02 0,02 0,02 0,02 0,02 0,02 0,02 0,02 0,02 0,02 0,02 0,02 0,02 0,02 0,02 0,02 0,02 0,02 0,02 0,02 0,02 0,02 0,02 0,02 0,02 0,02 0,02 0,02 0,02 0,02 0,02 0,02 0,02 0,02 0,02 0,02 0,02 0,02 0,02 0,02 0,02 0,02 0,02 0,02 0,02 0,02 0,02 0,02 0,02 0,02 0,02 0,02 0,02 0,02 0,02 0,02 0,02 0,02 0,02 0,02 0,02 0,02 0,02 0,02 0,02 0,02 0,02 0,02 0,02 0,02 0,02 0,02 0,02 0,02 0,02 0,02 0,02 0,02 0,02 0,02 0,02 0,02 0,02 0,02 0,02 0,02	W166K.T2U 24 heures
<b>66</b> °66	N	72U.72U 24 heures
99,97	1,00 1,00 1,00 1,00 1,00 1,00 1,00 1,00 1,00 1,00 1,00 1,00 1,00 1,00 1,00 1,00 1,00 1,00 1,00 1,00 1,00 1,00 1,00 1,00 1,00 1,00 1,00 1,00 1,00 1,00 1,00 1,00 1,00 1,00 1,00 1,00 1,00 1,00 1,00 1,00 1,00 1,00 1,00 1,00 1,00 1,00 1,00 1,00 1,00 1,00 1,00 1,00 1,00 1,00 1,00 1,00 1,00 1,00 1,00 1,00 1,00 1,00 1,00 1,00 1,00 1,00 1,00 1,00 1,00 1,00 1,00 1,00 1,00 1,00 1,00 1,00 1,00 1,00 1,00 1,00 1,00 1,00 1,00 1,00 1,00 1,00 1,00 1,00 1,00 1,00 1,00 1,00 1,00 1,00 1,00 1,00 1,00 1,00 1,00 1,00 1,00 1,00 1,00 1,00 1,00 1,00 1,00 1,00 1,00 1,00 1,00 1,00 1,00 1,00 1,00 1,00 1,00 1,00 1,00 1,00 1,00 1,00 1,00 1,00 1,00 1,00 1,00 1,00 1,00 1,00 1,00 1,00 1,00 1,00 1,00 1,00 1,00 1,00 1,00 1,00 1,00 1,00 1,00 1,00 1,00 1,00 1,00 1,00 1,00 1,00 1,00 1,00 1,00 1,00 1,00 1,00 1,00 1,00 1,00 1,00 1,00 1,00 1,00 1,00 1,00 1,00 1,00 1,00 1,00 1,00 1,00 1,00 1,00 1,00 1,00 1,00 1,00 1,00 1,00 1,00 1,00 1,00 1,00 1,00 1,00 1,00 1,00 1,00 1,00 1,00 1,00 1,00 1,00 1,00 1,00 1,00 1,00 1,00 1,00 1,00 1,00 1,00 1,00 1,00 1,00 1,00 1,00 1,00 1,00 1,00 1,00 1,00 1,00 1,00 1,00 1,00 1,00 1,00 1,00 1,00 1,00 1,00 1,00 1,00 1,00 1,00 1,00 1,00 1,00 1,00 1,00 1,00 1,00 1,00 1,00 1,00 1,00 1,00 1,00 1,00 1,00 1,00 1,00 1,00 1,00 1,00 1,00 1,00 1,00 1,00 1,00 1,00 1,00 1,00 1,00 1,00 1,00 1,00 1,00 1,00 1,00 1,00 1,00 1,00 1,00 1,00 1,00 1,00 1,00 1,00 1,00 1,00 1,00 1,00 1,00 1,00 1,00 1,00 1,00 1,00 1,00 1,00 1,00 1,00 1,00 1,00 1,00 1,00 1,00 1,00 1,00 1,00 1,00 1,00 1,00 1,00 1,00 1,00 1,00 1,00 1,00 1,00 1,00 1,00 1,00 1,00 1,00 1,00 1,00 1,00 1,00 1,00 1,00 1,00 1,00 1,00 1,00 1,00 1,00 1,00 1,00 1,00 1,00 1,00 1,00 1,00 1,00 1,00 1,00 1,00 1,00 1,00 1,00 1,00 1,00 1,00 1,00 1,00 1,00 1,00 1,00	T2U.W166K 24 heunes
66*66	0,0 0,0 0,0 0,0 0,0 0,0 0,0 0,0	Pollen W166K
£0,00	88 1,25 2,55 2,55 2,55 2,55 2,55 2,55 2,55 2,55 2,55 2,55 2,55 2,55 2,55 2,55 2,55 2,55 2,55 2,55 2,55 2,55 2,55 2,55 2,55 2,55 2,55 2,55 2,55 2,55 2,55 2,55 2,55 2,55 2,55 2,55 2,55 2,55 2,55 2,55 2,55 2,55 2,55 2,55 2,55 2,55 2,55 2,55 2,55 2,55 2,55 2,55 2,55 2,55 2,55 2,55 2,55 2,55 2,55 2,55 2,55 2,55 2,55 2,55 2,55 2,55 2,55 2,55 2,55 2,55 2,55 2,55 2,55 2,55 2,55 2,55 2,55 2,55 2,55 2,55 2,55 2,55 2,55 2,55 2,55 2,55 2,55 2,55 2,55 2,55 2,55 2,55 2,55 2,55 2,55 2,55 2,55 2,55 2,55 2,55 2,55 2,55 2,55 2,55 2,55 2,55 2,55 2,55 2,55 2,55 2,55 2,55 2,55 2,55 2,55 2,55 2,55 2,55 2,55 2,55 2,55 2,55 2,55 2,55 2,55 2,55 2,55 2,55 2,55 2,55 2,55 2,55 2,55 2,55 2,55 2,55 2,55 2,55 2,55 2,55 2,55 2,55 2,55 2,55 2,55 2,55 2,55 2,55 2,55 2,55 2,55 2,55 2,55 2,55 2,55 2,55 2,55 2,55 2,55 2,55 2,55 2,55 2,55 2,55 2,55 2,55 2,55 2,55 2,55 2,55 2,55 2,55 2,55 2,55 2,55 2,55 2,55 2,55 2,55 2,55 2,55 2,55 2,55 2,55 2,55 2,55 2,55 2,55 2,55 2,55 2,55 2,55 2,55 2,55 2,55 2,55 2,55 2,55 2,55 2,55 2,55 2,55 2,55 2,55 2,55 2,55 2,55 2,55 2,55 2,55 2,55 2,55 2,55 2,55 2,55 2,55 2,55 2,55 2,55 2,55 2,55 2,55 2,55 2,55 2,55 2,55 2,55 2,55 2,55 2,55 2,55 2,55 2,55 2,55 2,55 2,55 2,55 2,55 2,55 2,55 2,55 2,55 2,55 2,55 2,55 2,55 2,55 2,55 2,55 2,55 2,55 2,55 2,55 2,55 2,55 2,55 2,55 2,55 2,55 2,55 2,55 2,55 2,55 2,55 2,55 2,55 2,55 2,55 2,55 2,55 2,55 2,55 2,55 2,55 2,55 2,55 2,55 2,55 2,55 2,55 2,55 2,55 2,55 2,55 2,55 2,55 2,55 2,55 2,55 2,55 2,55 2,55 2,55 2,55 2,55 2,55 2,55 2,55 2,55 2,55 2,55 2,55 2,55 2,55 2,55 2,55 2,55 2,55 2,55 2,55 2,55 2,55 2,55 2,55 2,55 2,55 2,55 2,55 2,55 2,55 2,55 2,55 2,55 2,55 2,55 2,55 2,55 2,55 2,55 2,55 2,55 2,55 2,55 2,55 2,55 2,55 2,55 2,55 2,55 2,55 2,55 2,	Pollen T2U

REPARTITION DES ACIDES GRAS AU NIVEAU DES MONOGLYCOSYLCERAMIDES

## TABLEAU 19

TOTAL	$\begin{array}{cccccccccccccccccccccccccccccccccccc$	croisement formule analysé de Shortland
86° 06	28,10 28,10 28,10 28,10 28,10 28,10 28,10 28,10 28,10 28,10 28,10 28,10 28,10 28,10 29,56 1,77 28,10 28,10 28,10 29,56 1,77 28,10 29,56 1,77 28,10 29,56 1,77 28,10 29,56 1,77 28,10 29,56 1,77 28,10 29,56 1,77 28,10 29,56 1,77 28,10 29,56 1,77 28,10 29,56 1,77 1,65 1,77 1,65 1,77 1,65 1,77 1,65 1,77 1,75 1,75 1,75 1,75 1,75 1,75 1,75 1,75 1,75 1,75 1,75 1,75 1,75 1,75 1,75 1,75 1,75 1,75 1,75 1,75 1,75 1,75 1,75 1,75 1,75 1,75 1,75 1,75 1,75 1,75 1,75 1,75 1,75 1,75 1,75 1,75 1,75 1,75 1,75 1,75 1,75 1,75 1,75 1,75 1,75 1,75 1,75 1,75 1,75 1,75 1,75 1,75 1,75 1,75 1,75 1,75 1,75 1,75 1,75 1,75 1,75 1,75 1,75 1,75 1,75 1,75 1,75 1,75 1,75 1,75 1,75 1,75 1,75 1,75 1,75 1,75 1,75 1,75 1,75 1,75 1,75 1,75 1,75 1,75 1,75 1,75 1,75 1,75 1,75 1,75 1,75 1,75 1,75 1,75 1,75 1,75 1,75 1,75 1,75 1,75 1,75 1,75 1,75 1,75 1,75 1,75 1,75 1,75 1,75 1,75 1,75 1,75 1,75 1,75 1,75 1,75 1,75 1,75 1,75 1,75 1,75 1,75 1,75 1,75 1,75 1,75 1,75 1,75 1,75 1,75 1,75 1,75 1,75 1,75 1,75 1,75 1,75 1,75 1,75 1,75 1,75 1,75 1,75 1,75 1,75 1,75 1,75 1,75 1,75 1,75 1,75 1,75 1,75 1,75 1,75 1,75 1,75 1,75 1,75 1,75 1,75 1,75 1,75 1,75 1,75 1,75 1,75 1,75 1,75 1,75 1,75 1,75 1,75 1,75 1,75 1,75 1,75 1,75 1,75 1,75 1,75 1,75 1,75 1,75 1,75 1,75 1,75 1,75 1,75 1,75 1,75 1,75 1,75 1,75 1,75 1,75 1,75 1,75 1,75 1,75 1,75 1,75 1,75 1,75 1,75 1,75 1,75 1,75 1,75 1,75 1,75 1,75 1,75 1,75 1,75 1,75 1,75 1,75 1,75 1,75 1,75 1,75 1,75 1,75 1,75 1,75 1,75 1,75 1,75 1,75 1,75 1,75 1,75 1,75 1,75 1,75 1,75 1,75 1,75 1,75 1,75 1,75 1,75 1,75 1,75 1,75 1,75 1,75 1,75 1,75 1,75 1,75 1,75 1,75 1,75 1,75 1,75 1,75 1,75 1,75 1,75 1,75 1,75 1,75 1,75 1,75 1,75 1,75 1,75 1,75 1,75 1,75 1,75 1,75 1,75 1,75 1,75 1,75 1,75 1,75 1,75 1,75 1	Styles vierges W166K
99,99	0,33 0,43 0,43 0,43 0,43 0,43 0,43 0,43	w166.w166K 3 houres
99,99	0,13 0,22 0,23 0,23 0,23 0,23 0,23 0,23 0,2	W166K.T2U \$ heures
100,00	5,22 5,22 5,22 5,22 5,22 5,22 5,22 5,22 5,22 5,22 5,22 5,22 5,22 5,22 5,22 5,22 5,22 5,22 5,22 5,22 5,22 5,22 5,22 5,22 5,22 5,22 5,22 5,22 5,22 5,22 5,22 5,22 5,22 5,22 5,22 5,22 5,22 5,22 5,22 5,22 5,22 5,22 5,22 5,22 5,22 5,22 5,22 5,22 5,22 5,22 5,22 5,22 5,22 5,22 5,22 5,22 5,22 5,22 5,22 5,22 5,22 5,22 5,22 5,22 5,22 5,22 5,22 5,22 5,22 5,22 5,22 5,22 5,22 5,22 5,22 5,22 5,22 5,22 5,22 5,22 5,22 5,22 5,22 5,22 5,22 5,22 5,22 5,22 5,22 5,22 5,22 5,22 5,22 5,22 5,22 5,22 5,22 5,22 5,22 5,22 5,22 5,22 5,22 5,22 5,22 5,22 5,22 5,22 5,22 5,22 5,22 5,22 5,22 5,22 5,22 5,22 5,22 5,22 5,22 5,22 5,22 5,22 5,22 5,22 5,22 5,22 5,22 5,22 5,22 5,22 5,22 5,22 5,22 5,22 5,22 5,22 5,22 5,22 5,22 5,22 5,22 5,22 5,22 5,22 5,22 5,22 5,22 5,22 5,22 5,22 5,22 5,22 5,22 5,22 5,22 5,22 5,22 5,22 5,22 5,22 5,22 5,22 5,22 5,22 5,22 5,22 5,22 5,22 5,22 5,22 5,22 5,22 5,22 5,22 5,22 5,22 5,22 5,22 5,22 5,22 5,22 5,22 5,22 5,22 5,22 5,22 5,22 5,22 5,22 5,22 5,22 5,22 5,22 5,22 5,22 5,22 5,22 5,22 5,22 5,22 5,22 5,22 5,22 5,22 5,22 5,22 5,22 5,22 5,22 5,22 5,22 5,22 5,22 5,22 5,22 5,22 5,22 5,22 5,22 5,22 5,22 5,22 5,22 5,22 5,22 5,22 5,22 5,22 5,22 5,22 5,22 5,22 5,22 5,22 5,22 5,22 5,22 5,22 5,22 5,22 5,22 5,22 5,22 5,22 5,22 5,22 5,22 5,22 5,22 5,22 5,22 5,22 5,22 5,22 5,22 5,22 5,22 5,22 5,22 5,22 5,22 5,22 5,22 5,22 5,22 5,22 5,22 5,22 5,22 5,22 5,22 5,22 5,22 5,22 5,22 5,22 5,22 5,22 5,22 5,22 5,22 5,22 5,22 5,22 5,22 5,22 5,22 5,22 5,22 5,22 5,22 5,22 5,22 5,22 5,22 5,22 5,22 5,22 5,22 5,22 5,22 5,22 5,22 5,22 5,22 5,22 5,22 5,22 5,22 5,22 5,22 5,22 5,22 5,22 5,22 5,22 5,22 5,22 5,22 5,22 5,22 5,22 5,22 5,22 5,22 5,22 5,22 5,22 5,22 5,22 5,22 5,22 5,22 5,22 5,22 5,22 5,22 5,22 5,22 5,22 5,22	24 houres
66*66	0,1,1 0,1,2 0,1,0 0,1,0 0,1,0 0,1,0 0,1,0 0,1,0 0,1,0 0,1,0 0,1,0 0,1,0 0,1,0 0,1,0 0,1,0 0,1,0 0,1,0 0,1,0 0,1,0 0,1,0 0,1,0 0,1,0 0,1,0 0,1,0 0,1,0 0,1,0 0,1,0 0,1,0 0,1,0 0,1,0 0,1,0 0,1,0 0,1,0 0,1,0 0,1,0 0,1,0 0,1,0 0,1,0 0,0 0	W166K.T2U 24 houres
66*66	0,10 0,13 0,13 0,13 0,13 0,13 0,13 0,13	T2U.T2U 24 heures
66*66	0,27 0,27 0,27 0,27 0,27 0,27 0,27 0,27	T2U.W165K 24 heures
66* 66	1,127 1,127 1,127 1,127 1,127 1,127 1,127 1,127 1,127 1,127 1,127 1,127 1,127 1,127 1,127 1,127 1,127 1,127 1,127 1,127 1,127 1,127 1,127 1,127 1,127 1,127 1,127 1,127 1,127 1,127 1,127 1,127 1,127 1,127 1,127 1,127 1,127 1,127 1,127 1,127 1,127 1,127 1,127 1,127 1,127 1,127 1,127 1,127 1,127 1,127 1,127 1,127 1,127 1,127 1,127 1,127 1,127 1,127 1,127 1,127 1,127 1,127 1,127 1,127 1,127 1,127 1,127 1,127 1,127 1,127 1,127 1,127 1,127 1,127 1,127 1,127 1,127 1,127 1,127 1,127 1,127 1,127 1,127 1,127 1,127 1,127 1,127 1,127 1,127 1,127 1,127 1,127 1,127 1,127 1,127 1,127 1,127 1,127 1,127 1,127 1,127 1,127 1,127 1,127 1,127 1,127 1,127 1,127 1,127 1,127 1,127 1,127 1,127 1,127 1,127 1,127 1,127 1,127 1,127 1,127 1,127 1,127 1,127 1,127 1,127 1,127 1,127 1,127 1,127 1,127 1,127 1,127 1,127 1,127 1,127 1,127 1,127 1,127 1,127 1,127 1,127 1,127 1,127 1,127 1,127 1,127 1,127 1,127 1,127 1,127 1,127 1,127 1,127 1,127 1,127 1,127 1,127 1,127 1,127 1,127 1,127 1,127 1,127 1,127 1,127 1,127 1,127 1,127 1,127 1,127 1,127 1,127 1,127 1,127 1,127 1,127 1,127 1,127 1,127 1,127 1,127 1,127 1,127 1,127 1,127 1,127 1,127 1,127 1,127 1,127 1,127 1,127 1,127 1,127 1,127 1,127 1,127 1,127 1,127 1,127 1,127 1,127 1,127 1,127 1,127 1,127 1,127 1,127 1,127 1,127 1,127 1,127 1,127 1,127 1,127 1,127 1,127 1,127 1,127 1,127 1,127 1,127 1,127 1,127 1,127 1,127 1,127 1,127 1,127 1,127 1,127 1,127 1,127 1,127 1,127 1,127 1,127 1,127 1,127 1,127 1,127 1,127 1,127 1,127 1,127 1,127 1,127 1,127 1,127 1,127 1,127 1,127 1,127 1,127 1,127 1,127 1,127 1,127 1,127 1,127 1,127 1,127 1,127 1,127 1,127 1,127 1,127 1,127 1,127 1,127 1,127 1,127 1,127 1,127 1,127 1,127 1,127 1,127 1,127 1,127 1,127 1,127 1,127 1,127 1,127 1,127 1,127 1,127 1,127 1,127 1,127 1,127 1,127 1,127 1,127 1,127 1,127 1,127 1,127 1,127 1,127 1,127 1,127 1,127 1,127 1,127 1,127 1,127 1,127 1,127 1,127 1,127 1,127 1,127 1,127 1,127 1,127 1,127 1,127 1,127 1,127 1,127 1,127 1,127 1,127 1,127 1,127 1,127 1,127 1,127 1,127 1,127 1,127 1,127 1,127 1,127 1,127 1,127 1,127 1,127 1,127	Pollen W156K
66*66	1,01 1,00 0,81 0,69 0,56 0,56 0,56 0,56 0,56 0,56 0,56 0,56	Pollen T2U

TABLEAU 20

# REPARTITION DES ACIDES GRAS AU NIVEAU DES DIGLYCOSYLCERAMIDES

ę

BUS

TOTAL	$\begin{array}{cccccccccccccccccccccccccccccccccccc$	crossement formule avalyse de Shortland
66*66	1,20 1,20 1,20 1,20 1,20 1,20 1,20 1,20	Styles vierges W166K
66*66		W166K.W165K 8 heures
66*66	888 11 12 12 12 12 12 12 12 12 12	1155K.T2U 8 huutes
66*66	2,28 1,27 2,28 1,27 2,28 1,27 1,27 2,28 1,27 1,27 1,27 1,27 1,27 1,27 1,27 1,27	w156K.w166K 24 heutes
99 <b>.</b> 99	1,40 1,40 1,40 1,40 1,40 1,40 1,40 1,40 1,40 1,40 1,40 1,40 1,40 1,40 1,40 1,40 1,40 1,40 1,40 1,40 1,40 1,40 1,40 1,40 1,40 1,40 1,40 1,40 1,40 1,40 1,40 1,40 1,40 1,40 1,40 1,40 1,40 1,40 1,40 1,40 1,40 1,40 1,40 1,40 1,40 1,40 1,40 1,40 1,40 1,40 1,40 1,40 1,40 1,40 1,40 1,40 1,40 1,40 1,40 1,40 1,40 1,40 1,40 1,40 1,40 1,40 1,40 1,40 1,40 1,40 1,40 1,40 1,40 1,40 1,40 1,40 1,40 1,40 1,40 1,40 1,40 1,40 1,40 1,40 1,40 1,40 1,40 1,40 1,40 1,40 1,40 1,40 1,40 1,40 1,40 1,40 1,40 1,40 1,40 1,40 1,40 1,40 1,40 1,40 1,40 1,40 1,40 1,40 1,40 1,40 1,40 1,40 1,40 1,40 1,40 1,40 1,40 1,40 1,40 1,40 1,40 1,40 1,40 1,40 1,40 1,40 1,40 1,40 1,40 1,40 1,40 1,40 1,40 1,40 1,40 1,40 1,40 1,40 1,40 1,40 1,40 1,40 1,40 1,40 1,40 1,40 1,40 1,40 1,40 1,40 1,40 1,40 1,40 1,40 1,40 1,40 1,40 1,40 1,40 1,40 1,40 1,40 1,40 1,40 1,40 1,40 1,40 1,40 1,40 1,40 1,40 1,40 1,40 1,40 1,40 1,40 1,40 1,40 1,40 1,40 1,40 1,40 1,40 1,40 1,40 1,40 1,40 1,40 1,40 1,40 1,40 1,40 1,40 1,40 1,40 1,40 1,40 1,40 1,40 1,40 1,40 1,40 1,40 1,40 1,40 1,40 1,40 1,40 1,40 1,40 1,40 1,40 1,40 1,40 1,40 1,40 1,40 1,40 1,40 1,40 1,40 1,40 1,40 1,40 1,40 1,40 1,40 1,40 1,40 1,40 1,40 1,40 1,40 1,40 1,40 1,40 1,40 1,40 1,40 1,40 1,40 1,40 1,40 1,40 1,40 1,40 1,40 1,40 1,40 1,40 1,40 1,40 1,40 1,40 1,40 1,40 1,40 1,40 1,40 1,40 1,40 1,40 1,40 1,40 1,40 1,40 1,40 1,40 1,40 1,40 1,40 1,40 1,40 1,40 1,40 1,40 1,40 1,40 1,40 1,40 1,40 1,40 1,40 1,40 1,40 1,40 1,40 1,40 1,40 1,40 1,40 1,40 1,40 1,40 1,40 1,40 1,40 1,40 1,40 1,40 1,40 1,40 1,40 1,40 1,40 1,40 1,40 1,40 1,40 1,40 1,40 1,40 1,40 1,40 1,40 1,40 1,40 1,40 1,40 1,40 1,40 1,40 1,40 1,40 1,40 1,40 1,40 1,40 1,40 1,40 1,40 1,40 1,40 1,40 1,40 1,40 1,40 1,40 1,40 1,40 1,40	W166K.T2U 24 heutes
66°66	1,554 1,556 1,556 1,556 1,556 1,556 1,556 1,556 1,556 1,556 1,556 1,556 1,556 1,556 1,556 1,556 1,556 1,556 1,556 1,556 1,556 1,556 1,556 1,556 1,556 1,556 1,556 1,556 1,556 1,556 1,556 1,556 1,556 1,556 1,556 1,556 1,556 1,556 1,556 1,556 1,556 1,556 1,556 1,556 1,556 1,556 1,556 1,556 1,556 1,556 1,556 1,556 1,556 1,556 1,556 1,556 1,556 1,556 1,556 1,556 1,556 1,556 1,556 1,556 1,556 1,556 1,556 1,556 1,556 1,556 1,556 1,556 1,556 1,556 1,556 1,556 1,556 1,556 1,556 1,556 1,556 1,556 1,556 1,556 1,556 1,556 1,556 1,556 1,556 1,556 1,556 1,556 1,556 1,556 1,556 1,556 1,556 1,556 1,556 1,556 1,556 1,556 1,556 1,556 1,556 1,556 1,556 1,556 1,556 1,556 1,556 1,556 1,556 1,556 1,556 1,556 1,556 1,556 1,556 1,556 1,556 1,556 1,556 1,556 1,556 1,556 1,556 1,556 1,556 1,556 1,556 1,556 1,556 1,556 1,556 1,556 1,556 1,556 1,556 1,556 1,556 1,556 1,556 1,556 1,556 1,556 1,556 1,556 1,556 1,556 1,556 1,556 1,556 1,556 1,556 1,556 1,556 1,556 1,556 1,556 1,556 1,556 1,556 1,556 1,556 1,556 1,556 1,556 1,556 1,556 1,556 1,556 1,556 1,556 1,556 1,556 1,556 1,556 1,556 1,556 1,556 1,556 1,556 1,556 1,556 1,556 1,556 1,556 1,556 1,556 1,556 1,556 1,556 1,556 1,556 1,556 1,556 1,556 1,556 1,556 1,556 1,556 1,556 1,556 1,556 1,556 1,556 1,556 1,556 1,556 1,556 1,556 1,556 1,556 1,556 1,556 1,556 1,556 1,556 1,556 1,556 1,556 1,556 1,556 1,556 1,556 1,556 1,556 1,556 1,556 1,556 1,556 1,556 1,556 1,556 1,556 1,556 1,556 1,556 1,556 1,556 1,556 1,556 1,556 1,556 1,556 1,556 1,556 1,556 1,556 1,556 1,556 1,556 1,556 1,556 1,556 1,556 1,556 1,556 1,556 1,556 1,556 1,556 1,556 1,556 1,556 1,556 1,556 1,556 1,556 1,556 1,556 1,556 1,556 1,556 1,556 1,556 1,556 1,556 1,556 1,556 1,556 1,556 1,556 1,556 1,556 1,556 1,556 1,556 1,556 1,556 1,556 1,	T2U.T2U 24 heures
66' 66		T2U.W166K 24 heures
66*66		Pollen W165K
66*66	0,81 1,01 1,01 1,01 1,02 1,02 1,02 1,02 1,0	Pollen T2U

REPARTITION DES ACIDES GRAS AU NIVEAU DES TRIGLYCOSYLCERAMIDES

TABLEAU 21

(aunt)

and the second se		
TOTAL	$\begin{array}{cccccccccccccccccccccccccccccccccccc$	croisement formule analyse de Shortland
66*66	2,14 2,14 2,14 2,14 2,14 2,14 2,17 2,17 2,17 2,17 2,17 2,17 2,17 2,17	Styles vierges W166K
86,66	1,52 1,52 1,52 1,52 1,55 1,55 1,55 1,55 1,55 1,55 1,55 1,55 1,55 1,55 1,55 1,55 1,55 1,55 1,55 1,55 1,55 1,55 1,55 1,55 1,55 1,55 1,55 1,55 1,55 1,55 1,55 1,55 1,55 1,55 1,55 1,55 1,55 1,55 1,55 1,55 1,55 1,55 1,55 1,55 1,55 1,55 1,55 1,55 1,55 1,55 1,55 1,55 1,55 1,55 1,55 1,55 1,55 1,55 1,55 1,55 1,55 1,55 1,55 1,55 1,55 1,55 1,55 1,55 1,55 1,55 1,55 1,55 1,55 1,55 1,55 1,55 1,55 1,55 1,55 1,55 1,55 1,55 1,55 1,55 1,55 1,55 1,55 1,55 1,55 1,55 1,55 1,55 1,55 1,55 1,55 1,55 1,55 1,55 1,55 1,55 1,55 1,55 1,55 1,55 1,55 1,55 1,55 1,55 1,55 1,55 1,55 1,55 1,55 1,55 1,55 1,55 1,55 1,55 1,55 1,55 1,55 1,55 1,55 1,55 1,55 1,55 1,55 1,55 1,55 1,55 1,55 1,55 1,55 1,55 1,55 1,55 1,55 1,55 1,55 1,55 1,55 1,55 1,55 1,55 1,55 1,55 1,55 1,55 1,55 1,55 1,55 1,55 1,55 1,55 1,55 1,55 1,55 1,55 1,55 1,55 1,55 1,55 1,55 1,55 1,55 1,55 1,55 1,55 1,55 1,55 1,55 1,55 1,55 1,55 1,55 1,55 1,55 1,55 1,55 1,55 1,55 1,55 1,55 1,55 1,55 1,55 1,55 1,55 1,55 1,55 1,55 1,55 1,55 1,55 1,55 1,55 1,55 1,55 1,55 1,55 1,55 1,55 1,55 1,55 1,55 1,55 1,55 1,55 1,55 1,55 1,55 1,55 1,55 1,55 1,55 1,55 1,55 1,55 1,55 1,55 1,55 1,55 1,55 1,55 1,55 1,55 1,55 1,55 1,55 1,55 1,55 1,55 1,55 1,55 1,55 1,55 1,55 1,55 1,55 1,55 1,55 1,55 1,55 1,55 1,55 1,55 1,55 1,55 1,55 1,55 1,55 1,55 1,55 1,55 1,55 1,55 1,55 1,55 1,55 1,55 1,55 1,55 1,55 1,55 1,55 1,55 1,55 1,55 1,55 1,55 1,55 1,55 1,55 1,55 1,55 1,55 1,55 1,55 1,55 1,55 1,55 1,55 1,55 1,55 1,55 1,55 1,55 1,55 1,55 1,55 1,55 1,55 1,55 1,55 1,55 1,55 1,55 1,55 1,55 1,55 1,55 1,55 1,55 1,55 1,55 1,55 1,55 1,55 1,55 1,55 1,55 1,55 1,55 1,55 1,55 1,55 1,55 1,55 1,55 1,55 1,55 1,55 1,55 1,55 1,55 1,55 1,55 1,55 1,55 1,55 1,55 1,55 1,55 1,55 1,55 1,55 1,55 1,55 1,55 1,55 1,55	1155K.W165K \$ heures
66*65	1,85 0,96 0,96 0,96 0,96 0,96 0,96 0,96 0,96	W165K.T2U 3 heures
70,000	1,02 1,22 1,22 1,22 1,22 1,22 1,22 1,22	W156K.W166K 24 heutes
66*66	0,83 0,83 0,64 0,64 0,67 0,67 0,67 0,67 0,67 0,67 0,67 0,67	1166K.T2U 24 heures
66*66	1,2 2,2 2,2 2,2 2,2 2,2 2,2 2,2	T2U.T2U 24 heures
79,97	20,32 12,32 12,32 12,32 12,32 12,32 12,32 13,17 12,32 13,17 12,18 14,18 14,18 14,18 14,18 14,18 14,18 14,18 14,18 14,18 14,18 14,18 14,18 14,18 14,18 14,18 14,18 14,18 14,18 14,18 14,18 14,18 14,18 14,18 14,18 14,18 14,18 14,18 14,18 14,18 14,18 14,18 14,18 14,18 14,18 14,18 14,18 14,18 14,18 14,18 14,18 14,18 14,18 14,18 14,18 14,18 14,18 14,18 14,18 14,18 14,18 14,18 14,18 14,18 14,18 14,18 14,18 14,18 14,18 14,18 14,18 14,18 14,18 14,18 14,18 14,18 14,18 14,18 14,18 14,18 14,18 14,18 14,18 14,18 14,18 14,18 14,18 14,18 14,18 14,18 14,18 14,18 14,18 14,18 14,18 14,18 14,18 14,18 14,18 14,18 14,18 14,18 14,18 14,18 14,18 14,18 14,18 14,18 14,18 14,18 14,18 14,18 14,18 14,18 14,18 14,18 14,18 14,18 14,18 14,18 14,18 14,18 14,18 14,18 14,18 14,18 14,18 14,18 14,18 14,18 14,18 14,18 14,18 14,18 14,18 14,18 14,18 14,18 14,18 14,18 14,18 14,18 14,18 14,18 14,18 14,18 14,18 14,18 14,18 14,18 14,18 14,18 14,18 14,18 14,18 14,18 14,18 14,18 14,18 14,18 14,18 14,18 14,18 14,18 14,18 14,18 14,18 14,18 14,18 14,18 14,18 14,18 14,18 14,18 14,18 14,18 14,18 14,18 14,18 14,18 14,18 14,18 14,18 14,18 14,18 14,18 14,18 14,18 14,18 14,18 14,18 14,18 14,18 14,18 14,18 14,18 14,18 14,18 14,18 14,18 14,18 14,18 14,18 14,18 14,18 14,18 14,18 14,18 14,18 14,18 14,18 14,18 14,18 14,18 14,18 14,18 14,18 14,18 14,18 14,18 14,18 14,18 14,18 14,18 14,18 14,18 14,18 14,18 14,18 14,18 14,18 14,18 14,18 14,18 14,18 14,18 14,18 14,18 14,18 14,18 14,18 14,18 14,18 14,18 14,18 14,18 14,18 14,18 14,18 14,18 14,18 14,18 14,18 14,18 14,18 14,18 14,18 14,18 14,18 14,18 14,18 14,18 14,18 14,18 14,18 14,18 14,18 14,18 14,18 14,18 14,18 14,18 14,18 14,18 14,18 14,18 14,18 14,18 14,18 14,18 14,18 14,18 14,18 14,18 14,18 14,18 14,18 14,18 14,18 14,18 14,18 14,18 14	T2U.W165K 24 heures
86*66		Pollen W166K
96*66	1,22 1,22 1,22 1,22 1,25 1,25 1,25 1,25 1,25 1,25 1,25 1,25 1,25 1,25 1,25 1,25 1,25 1,25 1,25 1,25 1,25 1,25 1,25 1,25 1,25 1,25 1,25 1,25 1,25 1,25 1,25 1,25 1,25 1,25 1,25 1,25 1,25 1,25 1,25 1,25 1,25 1,25 1,25 1,25 1,25 1,25 1,25 1,25 1,25 1,25 1,25 1,25 1,25 1,25 1,25 1,25 1,25 1,25 1,25 1,25 1,25 1,25 1,25 1,25 1,25 1,25 1,25 1,25 1,25 1,25 1,25 1,25 1,25 1,25 1,25 1,25 1,25 1,25 1,25 1,25 1,25 1,25 1,25 1,25 1,25 1,25 1,25 1,25 1,25 1,25 1,25 1,25 1,25 1,25 1,25 1,25 1,25 1,25 1,25 1,25 1,25 1,25 1,25 1,25 1,25 1,25 1,25 1,25 1,25 1,25 1,25 1,25 1,25 1,25 1,25 1,25 1,25 1,25 1,25 1,25 1,25 1,25 1,25 1,25 1,25 1,25 1,25 1,25 1,25 1,25 1,25 1,25 1,25 1,25 1,25 1,25 1,25 1,25 1,25 1,25 1,25 1,25 1,25 1,25 1,25 1,25 1,25 1,25 1,25 1,25 1,25 1,25 1,25 1,25 1,25 1,25 1,25 1,25 1,25 1,25 1,25 1,25 1,25 1,25 1,25 1,25 1,25 1,25 1,25 1,25 1,25 1,25 1,25 1,25 1,25 1,25 1,25 1,25 1,25 1,25 1,25 1,25 1,25 1,25 1,25 1,25 1,25 1,25 1,25 1,25 1,25 1,25 1,25 1,25 1,25 1,25 1,25 1,25 1,25 1,25 1,25 1,25 1,25 1,25 1,25 1,25 1,25 1,25 1,25 1,25 1,25 1,25 1,25 1,25 1,25 1,25 1,25 1,25 1,25 1,25 1,25 1,25 1,25 1,25 1,25 1,25 1,25 1,25 1,25 1,25 1,25 1,25 1,25 1,25 1,25 1,25 1,25 1,25 1,25 1,25 1,25 1,25 1,25 1,25 1,25 1,25 1,25 1,25 1,25 1,25 1,25 1,25 1,25 1,25 1,25 1,25 1,25 1,25 1,25 1,25 1,25 1,25 1,25 1,25 1,25 1,25 1,25 1,25 1,25 1,25 1,25 1,25 1,25 1,25 1,25 1,25 1,25 1,25 1,25 1,25 1,25 1,25 1,25 1,25 1,25 1,25 1,25 1,25 1,25 1,25 1,25 1,25 1,25 1,25 1,25 1,25 1,25 1,25 1,25 1,25 1,25 1,25 1,25 1,25 1,25 1,25 1,25 1,25 1,25 1,25 1,25 1,25 1,25 1,25 1,25 1,25 1,25 1,25 1,25 1,25 1,25 1,25 1,25 1,25 1,25 1,25 1,25 1,25 1,25 1,25 1,25 1,25 1,25 1,25 1,25 1,25 1,25 1,25 1,25 1,25 1,25	Рогеа Тги

REPARTITION DES ACIDES GRAS AU NIVEAU DES TETRAGLYCOSYLCERAMIDES

BIIS ULLE TABLEAU 22

## 4 - Analyse de la copule osidique :

Elle est effectuée sur une partie aliquote de la phase méthanolique après extraction des acides gras au n-hexane et avant celle des bases à longue chaîne.

Le réactif d'hydrolyse utilisé renfermant de l'eau, une deuxième méthanolyse des sucres libérés est nécessaire. Elle est réalisée par une solution de méthanol chlorhydrique (HCl 0,5 M dans CH<sub>3</sub>OH anhydre) pendant 24 heures à 80°C. Après trifluoroacétylation du méthanolysat, l'analyse des oses est effectuée par chromatographie en phase gazeuse sur colonne d'OV 210 avec une programmation de température de 110°C à 210°C à raison de 1°C/minute.

## VARIATIONS DE LA COMPOSITION EN ACIDES GRAS

La distribution des acides gras des différentes classes de glycosphingolipides neutres a été analysée en fonction :

- des pollens et des styles vierges ;
- des styles pollinisés (auto et xénopollinisés),

et dans cette dernière éventualité la distribution des acides gras est envisagée suivant la longueur de la chaîne aliphatique (courte : C10 à C13 ; moyenne : C14 à C17 ; longue : C20 à C24), la distribution des acides gras à nombre impair d'atomes de carbone et selon le degré de saturation ou de désaturation des acides gras en C18 (stéarate, oléate, linoléate et linolénate).

Ies résultats de ces analyses sont consignés dans les différents tableaux 18,19,20,21 et 22.

Il nous a semblé intéressant de rechercher la possibilité d'une relation entre la teneur en acides gras en fonction de la nature des extraits (stylaire ou pollinique) et aussi en fonction du génotype responsable de l'incompatibilité (T2U ou W166K).

- and a case of the second	contract lances constraint with a theory	a narritulita di Parladi de standonarra din de naciona a da i denito en estadorioga	and a statement and a statement water of	and a second	and the state of the Balance of the state of	- dealers we wanted as a
acic	TrG C er	TGCer	D G Cer	MGCer	Cer	
Tass		0,4 .05	0 <sup>2</sup> - 2 0	0 4 - 0 5	0 Å N W	
11:0				R		
13:0						
0:91			{	k		
0.81						OLL
53:0						EZ
Passassessunte						T2U
1:01						
1:11						
1: 11						
1:21					k	
C: 81						
551						
54:1					AND	
200	TrGCer	TGCer	D G Cer	MGCer	Cer	enanan dingar, yer-eran
des gras	0,6 1,4	0,00	0 0 0 - N W	0,0,0,	0,0 - u u	
0:01						
13:0						
$0: 51 \\ 0: 91 \\ 0: 10$			N	Eini		
13 0 50:0						PO
55:0 53:0						
1:01		- Revenue de la companya de la compa				W
$\frac{11 : 11}{13 : 1}$						66K
1: 11						
1:91 1:21						
18:51 18:51						
5071 5511 5211						
1:\$2						1.500 Million (1990)

La répartition des acides gras au niveau des styles est représentée par la Ligne Les compositions des pollens sont exprimées relativement aux styles vierges W166h Tout point situé au-dessus de la droite 1 traduit la richesse des pollens et inversement, tout point situé en-dessous traduit la richesse des styles.

FIGURE 21

REPARTITION DES ACIDES GRAS DES GLYCOSPHINGOLIPIDES NEUTRES DES POLLENS



I - REPARTITION DES ACIDES GRAS DANS LES POLLENS ET LES STYLES VIERGES

Les résultats des analyses des pollens W166K et T2U et ceux des styles vierges W166K sont consignés dans la figure 21.

La répartition des acides gras au niveau des styles est représentée par la ligne 1. Les compositions des pollens sont exprimées relativement aux styles vierges W166K. Tout point situé au-dessus de la droite 1 traduit la richesse des pollens et inversement, tout point situé en-dessous traduit la richesse des styles.

Nous constatons que la composition en acides gras des pollens et des styles vierges est très homogène, d'où la grande homogénéité des profils de distribution des acides gras quelle que soit la nature stylaire ou pollinique des extraits et/ou le génotype analysé.

Cependant, il est évident que les pollens (W166K et T2U) très proches l'un de l'autre, se différencient des styles vierges W166K par leur richesse relative en acides gras à chaîne carbonée courte et par leur faible état de désaturation.

Il convient également de souligner l'individualisation des TrGCer des pollens qui s'éloignent nettement des autres classes de glycosphingolipides par leur forte teneur en acides gras à chaîne longue (C18 à C24) saturée ou insaturée et par la diminution concomitante des teneurs en acides gras à chaîne courte (C10 à C17).

II - EVOLUTION DU DEGRE DE SATURATION EN FONCTION DU TYPE DE POLLINISATION

Nous avons examiné globalement l'évolution du degré de saturation dans les différentes classes de glycosphingolipides indépendamment de la longueur de la chaîne aliphatique dans les styles auto et xénopollinisés. Les résultats sont consignés dans le tableau 23. : acides gras saturēs - I : acides gras insaturēs

S

Styles autopollinisés W166K.W166K 8 heures Styles autopollinisés W166K.W166K 24 heures Styles xénopollinisés W166K.T2U & heures Styles xénopollinisés W166K.2TU 24 heures Styles vierges W166K Styles autopollinisés T2U.T2U 24 heures Pollen T2U Pollen W166K Styles xénopollinisés 12U.W166K 24 heures 54,97 52,96 49,09 47,13 49,96 64,14 66,02 62,67 65,20 S 50,89 52,85 45,00 55,85 50,01 33,96 47,03 37,27 34,79 Cer M 0,81 0,51 83,0 0,59 1,03 1,12 1/S0,53 1,00 0,55 65,31 48,87 51,12 60,82 39,17 59,43 40,56 52,64 47,34 70,49 29,50 65,64 34,33 S 70,28 29,70 70,44 29,55 34,68 MGCer H 1,04 0,64 9,68 0,52 0,53 0,39 0,41 Z/J 0,42 0,41 73,53 62,01 58,89 74,45 66,78 80,14 60,82 68,19 63,27 5 DGCen 41,12 26,45 39;18 37,93 19,85 31,80 25,54 33,21 36,72 H 0,69 0,35 0,46 0,24 0,64 0,61 0,58 0,34 0,49 1/S69,74 63,13 57,52 73,59 69,66 72,39 72,27 62,41 70,26 5 TGCer 26,40 30,24 36,86 27,60 30,33 42,47 37,58 29,73 27,72 M 0,42 0,35 0,43 0,43 0,58 0,73 0,38 0,38 0,60 1/S58,66 60,26 59 61,31 60,12 91,38 65,73 70,36 63,68 5 61 39,86 38,68 41,33 39,71 40,38 34,25 29,62 36,09 ThGCen 8,61 2 0,66 0,63 0,65 0,67 0,42 0,70 60,09 0,52 0,56 1/S

TABLEAU 23

EVOLUTION DU DEGRE DE SATURATION EN FONCTION DU MODE DE POLLINISATION

ę

BUS

## 1 - Influence de la xénopollinisation :

L'influence de la xénopollinisation est envisagée de 0 à 8 heures puis de 8 à 24 heures, ces deux écarts étant d'une importance significative dans la complexité de la réponse incompatible.

Après 8 heures de croisement compatible, toutes les classes de glycosphingolipides neutres présentent, à l'exception des triglycosylcéramides, une nette augmentation des teneurs en acides gras insaturés. Puis après 24 heures de xénopollinisation, une composition très différente en acides gras est observée. Elle est caractérisée par la diminution des teneurs en acides gras insaturés.

Le pollen T2U, responsable de la pollinisation compatible, ne peut être à l'origine de cette composition puisqu'il est caractérisé par des glycosphingolipides plus saturés que ceux des styles.

Une analyse plus fine de ces résultats, conduit à considérer qu'après 24 heures de pollinisation, deux types de comportement se sont individualisés :

- d'une part, celui des céramides et des monoglycosylcéramides ;
- d'autre part, celui qui correspond aux groupes des di, tri et tétraglycosylcéramides.

Le premier groupe diffère du second par sa nette désaturation plus élevée que celle qui est rencontrée dans le pollen.

## 2 - Influence de l'autopollinisation :

L'influence de l'autopollinisation est recherchée par l'analyse de l'évolution du degré de saturation et de sa complexité au cours de l'incompatibilité. Nous constatons que le degré de saturation évolue, comme dans le cas de la xénopollinisation, il augmente dans un premier temps, puis diminue en fonction de la durée de la pollinisation.

Ce tableau est général, seuls les triglycosylcéramides présentent une évolution différente. Il est intéressant de rappeler ici la pauvreté relative du pollen W166K en acides gras insaturés par rapport aux teneurs relevées chez le style vierge de même génotype.

## EVOLUTION DU DEGRE DE SATURATION AU NIVEAU DES DIFFERENTS GLYCOSPHINGOLIPIDES NEUTRES

GSL	C	er	MGC	Cer	DGC	Cer	TGC	er	TrGCer		
	-+-	X	+	×		×	-	×	+	X	
I/S				$\bigwedge$							

A) Influence du mode et de la durée de la pollinisation

B) Influence du génotype du style pollinisé

	Ce	er	MGC	Cer	DGC	Cer	TGC	er	TrGCer	
	w166к	T2U	W166K	T2U	w166к	T2U	W166K	T2U	W166K	T2U
I/S	2- L 3-	+ 4 ×	$+\langle x$	+ > ×	+-	+ > %	$+> \times$	$+<\times$	+> X	4) X
	te na sport ann "sport afr faafaaf "storfood	-{	<×				+ )	×	a, accordances, aggregatorea de rechte de 2 agences	

La première flèche illustre le sens des variations pour la période 0-8 heures; la seconde flèche les représente au cours de la période 8-24 heures.

Le sigle x correspond à la xénopollinisation Le sigle + correspond à l'autopollinisation.

Les cases hachurées ou en pointillés témoignent de l'idendité de comportement pour une classe de glycosphingolipides entre auto et xénopollinisation.

I : acides gras insaturés

S : acides gras saturés



La xénopollinisation et l'autopollinisation ne s'opposent pas par le sens des variations mais par leur intensité. Ainsi, la figure 22a met en évidence après 24 heures de croisement que l'autopollinisation diffère essentiellement de la xénopollinisation par le degré de saturation plus faible au niveau des céramides et monoglycosylcéramides, plus élevé au niveau des di, tri et tétraglycosylcéramides des styles incompatibles.

## 3 - Influence du génotype :

Le génotype n'influence pas ces observations. Nous pouvons en effet comparer, après 24 heures de croisement, l'évolution du degré de saturation des divers glycosphingolipides en fonction de la pollinisation (figure 22b).

L'autopollinisation se traduit, indépendamment du génotype du style pollinisé, par la diminution des teneurs en acides gras insaturés par rapport à celles des acides gras saturés au niveau des céramides et des monoglycosylcéramides et par l'augmentation de ce même rapport dans toutes les autres classes de glycosphingolipides (di et tétraglycosylcéramides). Une seule exception à ces cbservations concerne le comportement des triglycosylcéramides qui se rapproche dans ses variations des céramides et des monoglycosylcéramides.

La désaturation des acides gras, par ses relations avec le métabolisme et notamment avec le catabolisme respiratoire semble être une donnée importante à considérer sous l'angle de ses variations au niveau des glycosphingolipides neutres en fonction de la pollinisation. Il a en effet, été montré que la pollinisation (compatible et surtout incompatible) entraîne un accroissement respiratoire à partir de substrats divers (ROGGEN, 1967).

C'est pourquoi dans cet aspect de l'étude des relations entre glycosphingolipides et pollinisation, nous avons envisagé les variations du rapport taux des acides gras à nombre impair d'atomes de carbone/taux des acides gras à nombre pair d'atomes de carbone (I/P).

1 H •0 acides gras insatures.

Styles xénopollinisés T2U.W166K 24 heures Styles autopollinisés T2U.T2U 24 heures Styles xénopollinisés W166K.T2U 24 heures Pollen T2U Pollen W166K 5 H •• acides acides gras satures gras 2 nombre 0,13 0,19 0,08 0,12 0 .08 impairs d'atomes 60,09 0,16 0,06 0,12 0,06 0,18 0,14 0,13 0,23 0,13 10,05 60,09 80,0 10,05 0,07 de carbone 0,08 0,04 0,07 0,07 0,05 80,08 0,08 0,15 0,07 0,07 t 0,14 0,12 80,0 0,12 0,12 9 •• 0,12 0,11 0,07 0,11 0,10 acides gras à nombre pairs d'atomes de carbone 0,16 0,10 0,58 0,19 0,13 0,18 0,14 0,15 0 0 25 222 0,16 0,17 0,10 0,13 0,18 0,40 0,27 0,24 0,17 0,45 0,06 0,18 0,11 • • N 18 0,16 0,14 0,03 0,11 60,09 0,12 0,14 0,21 60.09 0,39

EVOLUTION DES RAPPORTS DES POLLENS, I/P, DES STYLES VIERGES, AUTOPOLLINISES IS/PS, II/PI DANS LES DIFFERENTS ET XENOPOLLINISES **GLYCOSPHINGOLIPIDES** NEUTRES

TABLEAU 24



••

Styles autopollinisés W166K.W166K 24 heures

Styles autopollinisés W166X.W166X 8 heures

0,09

0,07

0,11

60,09

80,08

0,11

0,15

0,11

0

21

0,11

0,10

0,14

0,13

0,13

0,14

Styles

vierges

W166K

0,10

0,15

0,04

10,07

0,06

0,07

0,10

0,07

0,19

0,10

0,11

0,10

0,15

0,15

0,16

1/p

IS/PS

II/PI

1/p

IS/PS

II/PI

1/P

IS/PS

II/PI

1/p

IS/PS

II/PI

T/P

IS/PS

II/PI

TRGCer

TGCer

MGCer

DGCer

Cer

Styles xénopollinisés W166K.T2U 8 heures

0,14.

0,11

0,18

0,12

0,12

0,12

0,10

0,07

0,14

0,10

0,11

0,15

0,14

0,15

0,14

0,14

0,12

0,16

0,06

0,05

10,10

0,16

0,19

0,13

0,19

0,14

0

w4

0,18

0,18

0 18

EVOLUTION EN FONCTION DU TEMPS DU RAPPORT I/P DANS LES DIVERS CLASSES DE GLYCOSPHINGOLIPIDES



## III - VARIATIONS DU RAPPORT : TAUX DES ACIDES GRAS A NOMBRE IMPAIR D'ATOMES DE CARBONE / TAUX DES ACIDES GRAS A NOMBRE PAIR (I/P)

Le rapport I/P sera compris soit indépendamment du degré de saturation chez tous les acides gras sans distinction (I/P), soit chez les seuls acides gras saturés (IS/PS), soit enfin chez les acides gras désaturés (II/PI) (tableau 24).

## 1 - Variations du rapport I/P :

a) <u>après xénopollinisation</u>. La comparaison des compositions en acides gras des styles vierges et des styles xénopollinisés met en évidence, après pollinisation de 0 à 8 heures, deux types de comportement qui vont s'opposer :

- celui des Cer-MGCer à forte accélération de l'incorporation des acides gras à nombre impair d'atomes de carbone ;

- celui des DGCer, TGCer et TrGCer pour lesquels aucune variation dans l'évolution du rapport I/P n'est appréciée par rapport aux résultats des styles vierges W166K.

Par contre, après 24 heures de pollinisation, le taux des acides gras à chaîne carbonée à nombre impair d'atomes de carbone augmente chez les Cer, DGCer et TGCer, il diminue chez les autres glycosphingolipides (MGCer et TrGCer).

 b) <u>après autopollinisation</u>. La comparaison des styles vierges et des styles autopollinisés est envisagée dans les mêmes conditions de 0 à 8 heures, puis de 8 à 24 heures.

Après 8 heures de pollinisation incompatible (W166K.W166K) les MGCer et DGCer possèdent un taux d'acides gras à nombre impair d'atomes de carbone très élevé par rapport à celui des styles vierges. Ce taux est pratiquement inchangé ou légèrement diminué pour les Cer, TGCer et TrGCer.

Après 24 heures de pollinisation, le taux des acides gras impairs a encore augmenté sauf au niveau des MGCer.

c) <u>comparaison entre auto et xénopollinisation</u>. Si nous comparons auto et xénopollinisation, on peut dire que la valeur du rapport I/P sera plus élevée en xénopollinisation chez les Cer et les MGCer de 0 à 8 heures à l'exception des DGCer chez qui ce rapport diminue. De 8 à 24 heures, la xénopollinisation est EVOLUTION EN FONCTION DU TEMPS DU RAPPORT II/PI DANS LES DIVERSES CLASSES DE GLYCOSPHINGOLIPIDES



toujours marquée par l'augmentation du rapport I/P pour les Cer, MGCer et TGCer, seuls les DGCer et les TrGCer auront un comportement inverse de celui que nous venons de constater (figure 23).

## 2 - Variations du rapport IS/PS :

L'évolution du rapport IS/PS est envisagée en fonction du temps de pollinisation. Nous constatons que l'évolution du rapport I/P (acides gras saturés) est identique quelle que soit la pollinisation considérée (compatible ou incompatible) chez les Cer, MGCer, TGCer. Notons cependant, que la valeur de ce rapport est plus faible en autopollinisation. Par contre, la valeur de ce rapport sera plus élevée en autopollinisation chez les DGCer et TrGCer.

## 3 - Variations du rapport II/PI :

Nous avons également analysé l'évolution du rapport I/P des acides gras insaturés en fonction de la pollinisation (compatible ou incompatible) et de sa durée. Xénopollinisation et autopollinisation sont toutes deux marquées par l'identité de l'évolution du rapport II/PI chez les Cer, MGCer et TGCer, bien que ce rapport soit également plus faible en autopollinisation. Par contre, ces pollinisations sont suivies d'un comportement nettement plus complexe des DGCer et TrGCer où les rapports sont antagonistes en fonction du temps de croisement (figure 24).

## 4 - Variations des rapports I/P, IS/PS et II/PI en fonction du génotype :

Les variations des rapports I/P, IS/PS et II/PI ont été envisagées en fonction du génotype du style. L'examen du tableau 25 met en évidence l'homogénéité des rapports considérés et cela indépendamment du génotype des styles et du glycosphingolipide considéré à l'exception des TrGCer.

## TABLEAU 25

EVOLUTION DES RAPPORTS I/P, IS/PS, II/PI DANS LES DIVERS GLYCOSPHINGOLIPIDES NEUTRES EN FONCTION DU GENOTYPE DU STYLE POLLINISE

	/ ا	ΎΡ	IS,	/PS	ii∕ Pi		
	w166k	t2u	w166k	t2u	w166k	t2u	
CER	<b>∻&lt;</b> ≭	+<×	+< ×	+<×	4•<%		
MGCER	+ < <b>x</b>	+<×	+<×	+<×	+≥×	+ ≥×	
DGCER	+>×	+>x	+>×	<b>↓</b> >×	<b>-</b>	*>:\$	
TGCER	+ < x	+ < ×	+<×	+<×	+<×	+ < ×	
TRGCER	>ે ્ર્	• <b>;</b> ° < X	e 22 - 24	-p. 63	+ < ×	+<×	

acides gras à nombre impair d'atomes de carbone Ι :

acides gras à nombre pair d'atomes de carbone Р :

- ŞI :
- acides gras saturés acides gras insaturés :
- + autopollinisation :
- xénopollinisation x •

Les cases laissées en blanc témoignent de l'identité de comportement d'une classe de glycosphingolipides pour les 2 génotypes étudiés.



## TABLEAU 26

DISTRIBUTION DES ÁCIDES GRAS A CHAINE COURTE (C10 A C13)

## AU NIVEAU DES GLYCOSPHINGOLIPIDES NEUTRES



A) Influence du mode et de la durée de la pollinisation

B) Influence du génotype du style pollinisé

GSL acides gras	Cer		MCCer		DGCer		TCCer		TrGCer	
	W166K	T2U	w166K	T2U	w166k	T2U	W166K	T2U	w166k	T2U
C10:0,1		+>×	+> X	+<×		4- )- X	+> ×	+ { X		+ <x< td=""></x<>
C11 :0,1		+	+{ ×	<b>+</b> <×	÷, , ,	÷2%	+< ×	<b>+</b> <×		+<×
C12:0,1	<b>*</b> >×	477 %	+< ×	<b>+</b> < X	<b></b>		+<×	+ < x		+ < X
C13:0,1	• •	<b>4</b> >X	+> X	<b>+</b> {×	23		+ <b>〈</b> X	+< X	<i>\$</i> 72%	+<×
	+>	×	+•	(X	+)	X	+	<×	+>×	+

La première flèche illustre le sens des variations pour la période de 0-8 heures ; la seconde flèche les représente au cours de la période 8-24 heures.

Le sigle x correspond à la xénopollinisation Le sigle + correspond à l'autopollinisation.

les cases hachurées témoignent de l'identité de comportement pour une classe de glycosphingolipides entre auto et xénopolipides.

## 5 - Conclusion :

En conclusion, l'autopollinisation est suivie d'une diminution de la teneur en acides gras à nombre impair d'atomes de carbone (saturés ou non) chez les Cer, MGCer et TGCer qui sont des glycosphingolipides à nombre impair de résidus osidiques.

Il s'agit là, semble-t-il, d'un processus général indépendant du génotype du style (W166K cu T2U) qui sera pollinisé. Seuls les DGCer et TrGCer, à structure osidique différente, montrent des variations en relation avec le génotype du style pollinisé.

## IV - EVOLUTION DE LA REPARTITION DES ACIDES GRAS COURTS EN C10, C11, C12 ET C13

L'évolution de la distribution des acides gras à chaînes courtes, saturées ou insaturées (C10 à C13), est envisagée au niveau des divers glycosphingolipides neutres après auto et xénopollinisation. Les résultats sont reportés dans le tableau 26a ; la première flèche illustre le sens de la variation dans une période de 0 à 8 heures ; la seconde flèche la représente au cours de la période de 8 à 24 heures. Les sigles suivants correspondent :

-x: à la xénopollinisation ; - + : à l'autopollinisation.

## 1 - Influence de la durée et du type de pollinisation :

D'une manière générale, le sens de variations des teneurs en acides gras courts, par rapport au temps 0, est identique à une exception près (C10 : 1) après 8 heures d'auto et de xénopollinisation. Ainsi seule l'amplitude de ces variations différencie les deux types de pollinisation après 8 heures de croisement.

Par contre, cette répartition des acides gras courts subit une évolution différente après 24 heures de croisement, en fonction du type compatible ou non de celui-ci. Cette opposition auto-xénopollinisation est particulièrement
nette au niveau des MGCer, DGCer et TrGCer, car en ce qui concerne les Cer et TGCer, l'autopollinisation va induire le même type de variations que la

Ainsi, l'autopollinisation et la xénopollinisation sont suivies après 8 heures de croisement, d'une baisse de la teneur en acides gras à chaîne courte au niveau des Cer, DGCer et TrGCer et d'une augmentation de la teneur de ces mêmes acides gras au niveau des MGCer et TGCer.

Les céramides représentant environ 1/3 des glycosphingolipides neutres, il est normal que les variations enregistrées à leur niveau coïncident avec celle des glycosphingolipides neutres totaux, mais cette évolution ne concerne pas tous les glycosphingolipides.

# 2 - Influence du génotype :

xénopollinisation.

Les variations présentées par la composition en acides gras, en fonction du génotype du style pollinisé, sont reportées tableau 26b . Les sigles utilisés sont identiques à ceux du tableau précédent.

A l'exception des TrGCer, pour lesquels le génotype du style pollinisé a une importance, les variations s'effectuent dans le même sens. L'autopollinisation, après 24 heures de croisement, est caractérisée par des Cer et des DGCer enrichis en acides gras courts et par des MGCer et TGCer appauvris par contre en ces mêmes acides gras courts. Par ces traits, l'autopollinisation s'éloigne quantitativement de la xénopollinisation, indépendamment du génotype du style qui sera pollinisé.

 V - EVOLUTION DE LA REPARTITION DES ACIDES GRAS A CHAINE MOYENNE EN C14, C15, C16 et C17

Dans le même esprit, nous avons envisagé l'évolution en fonction du temps de pollinisation de la répartition plus ou moins quantitative des acides gras à chaîne moyenne après auto et xénopollinisation. DISTRIBUTION DES ACIDES GRAS A CHAINE MOYENNE (C14 A C17)

AU NIVEAU DES GLYCOSPHINGOLIPIDES NEUTRES

	GSL	Ce	er	MGCe	r	DGC	er	TGC	er	TrGCe	er
acides gras			Х	Provide and a second	Х	4	· X		Х	m   so	Х
C14	:0,1	11	1			, fait	X	6	>1	11	$\wedge$
C 15	:0,1	×./	X. /			1	66	66	11	1	1
C 16	:0,1	×7		\_/	N/	1	1	1ª /s	1	1	1
C17	:0,1	N/	\./.			1	1ª 1ª	17			6

A) Influence du mode et de la durée de la pollinisation

B) Influence du génotype du style pollinisé

GSL	Ce	r	MGC	91.	DGC	, , ,	TGC€	er	TrGC	er
acides gras	w166к	12U	w166к	T2U	w166к	T2U	w166K	T2U	w166к	T2 U
C14:0,1	+)×	47%	-+	4.14	L 2.		4-4 <sup>-</sup> X	443	4.3%	-4 ( X
C 15:0,1	+{x	- <del>1</del> >%		-1-22	>x		4-{*		ЧЭ́х	14-Q2
C 16:0,1	- <del>1</del> .)x	÷2×	- <del>4-</del> >×			45×	44		43 X	+>>
C 17:0,1	+{X	-+{x	4)×	4 ( X		- 4- ÇX	4.62	1. to X 12	+)×	- 30K
	+ < ×	+>×	+>×	+ <×	+	×	+	< ×	+>×	+< ×

La première flèche illustre le sens des variations pour la période de 0-8 heures ; la seconde flèche les représente au cours de la période 8-24 heures.

 $\widehat{BHS}$  Le sigle x correspond à la xénopollinisation Inte Le sigle + correspond à l'autopollinisation.

Les cases hachurées témoignent de l'identité de comportement pour une classe de glycosphingolipides entre auto et xénopollinisation.

## 1 - Influence de la durée et du type de pollinisation :

L'examen du tableau 27a conduit à formuler quelques remarques concernant les influences du temps de pollinisation sur la répartition de ces acides gras. Après 8 heures de pollinisation (compatible ou incompatible) nous relevons que la répartition des acides gras au niveau des Cer, MGCer et DGCer montre la même évolution, seules les amplitudes de ces variations diffèrent. Par contre, au niveau des TGCer et TrGCer on peut noter des différences induites par la xéno et l'autopollinisation. D'une manière générale, les teneurs de ces acides gras auraient tendance à diminuer.

Après 24 heures de croisement, il y a peu de différences au niveau des Cer et des MGCer quant à l'évolution de la répartition de ces acides gras entre auto et xénopollinisation. C'est au niveau des DGCer, TGCer et TrGCer que des différences surviennent, qui intéressent plus particulièrement les acides gras insaturés.

# 2 - Influence du génotype après 24 heures de croisement :

L'influence du génotype du style pollinisé a été recherchée, ainsi que le souligne le tableau 27b, où les sigles employés sont les mêmes que ceux utilisés pour les tableaux précédents.

Certes des différences sont évidentes entre les teneurs en acides gras au niveau des diverses classes de glycosphingolipides quelle que soit la pollinisation (compatible ou incompatible) en fonction du génotype du style pollinisé. Cependant, il semble difficile de définir une orientation générale. Les styles W166K et T2U ne réagissent pas de façon identique. Par manque d'informations concernant les styles vierges T2U, il nous est impossible de conclure plus amplement.

DISTRIBUTION DES ACIDES STEARIQUE, OLEIQUE, LINOLEIQUE ET LINOLENIQUE

AU NIVEAU DES GLYCOSPHINGOLIPIDES NEUTRES

GSL	Cer		MGCe	er	DGC	er	TGC	er	TrGC	er
acides gras	+	Х	+	Х	+	Х	-}-	Х	+	Х
C 18 · 0	\		N 1	× 1	X X	1	1	1 N	<u>به</u> م	138 A
<b>C</b> 18:1	\$. A.	\$ \$	<b>\</b> 1	× 1	1 1	1			* 1	66
C18:2	N. A.	\./	×. /	N /	<b>A</b> A	1			A A	1
C18:3	×./	×,	1	<u>/</u>	\$* \$	× 1			\$ A	66

A) Influence du mode et de la durée de la pollinisation

B) Influence du génotype du style pollinisé

GSL	Cei	r	MGC	Cer	DGC€	5 <b>I.</b>	TGC	er	TrGC	er
acides gras	W166K	T2U	W166K	T2U	w166к	T2U	W166K	T2U	w166k	T2U
C18:0		\$.>.X	- XX	\$- <i>\$</i> \$	-4- > × -	<b>.</b>		+	+ > ×	··· > 7:
C18 : 1	* { >	4-7.8	+ ( X	4- 4 20	+ > ×		÷	+> <i>×</i>	-7.X	
C18 :2	+		+ < X			4 ( X		+ < ×	+> ×	
C18:3	+ { >		$+\langle x$	4-20	+- < <	~	- > <b>x</b>	+ < ×	+>*	
		+<	< X				+>	×X		

La première flèche illustre le sens des variations pour la période de 0-8 heures ; la seconde flèche les représente au cours de la période 8-24 heures ;

Le sigle x correspond à la xénopollinisation Le sigle + correspond à l'autopollinisation.

Les cases hachurées témoignent de l'identité de comportement pour une classe de glycosphingolipides entre auto et xénopollinisation.

VI - EVOLUTION DE LA REPARTITION DES ACIDES GRAS EN C18 SATURES OU INSATURES

Leur analyse est conduite selon les mêmes critères que précédemment, c'est-à-dire que nous allons suivre l'évolution de la répartition des acides gras en C18 en fonction du temps de pollinisation (8 et 24 heures) et du génotype (tableau 28a et b).

#### 1 - Influence de la durée et du type de pollinisation :

L'évolution de la répartition des acides gras en C18 peut être comprise en l'examinant à travers les deux modes de comportement déjà identifiés : celui des Cer, MGCer et TGCer d'une part, celui des DGCer et TrGCer d'autre part.

Dans le premier groupe, la répartition des stéarate, oléate, linoléate et linolénate suit des évolutions parallèles après auto ou xénopollinisation. Les Cer et MGCer par exemple, sont caractérisés en général par une baisse de la teneur de ces acides gras après 8 heures de croisement, suivie d'un accroissement de leurs valeurs après 24 heures. Au niveau des TGCer, la xénopollinisation et l'autopollinisation entraînent une diminution constante de la teneur en acides gras insaturés (C18 : 1, 2 et 3).

Chez les DGCer et TrGCer, la répartition de ces acides gras présente une évolution différente indépendamment de la pollinisation compatible ou incompatible. Les différences sont manifestes dans l'intervalle de temps 8 à 24 heures.

### 2 - Influence du génotype après 24 heures de croisement :

L'influence du génotype après 24 heures de croisement est envisagée par la comparaison de la répartition des acides gras (C18 : 0,1,2 et 3) dans les styles W166K et T2U après 24 heures de croisements compatibles ou incompatibles. Les résultats sont rassemblés dans le tableau 28b.

Quel que soit le génotype du style, les résultats obtenus confirment notre division des glycosphingolipides selon les deux comportements précédemment distingués :

83

DISTRIBUTION DES ACIDES GRAS A LONGUE CHAINE (C20 A C24)

## AU NIVEAU DES GLYCOSPHINGOLIPIDES NEUTRES

GSL CSL	Ce	r	MGC	er	DGC	er	TGC	er	TrGC	Cer
acides gras		×	+	Х	+	×	+	×	+	×
<b>C</b> 20:0,1	1	<i>A</i> \	1	A f	A P	J J	p p	<i>j</i> 8 <i>j</i> 4	<i>₹</i>	1
<b>C</b> 22:0,1	1	1	\$ \$		<i>J</i> 9 <i>J</i> 9	<b>N 1</b>	<i>N N</i>	4.9	15	<b>A</b> <i>P</i>
<b>C</b> 23:0,1	1	Ĵ.	* *	F	p , p	66	X /	N/	× ×	۶ ک
C 24:0,1	1.	1	1	تعر بحر	× 1	AN	g. p.	g g	, <b>9</b>	∕ ∖

A) Influence du mode et de la durée de la pollinisation.

B) Influence du génotype du style pollinisé

GSL	Ce	<b>1</b>	MGC	er	DGCe	er	TGCe	er	TrGC	er
acides gras	W166K	T2U	w166к	T2U	w166к	T2U	w166K	T2U	w166к	T2U
<b>C</b> 20:0,1	753		44 °			5. X X	$\langle \cdot \rangle \times$	+	,2-3	$\langle \cdot \rangle \langle \cdot \rangle$
<b>C</b> 22:0,1	7-	*>*	$+\langle \wedge$			* < 2		+ < X	+ < ×	
<b>C</b> 23:0,1	8-3-X		$(+ \langle X \rangle$		+ > *		+= X	+ =x	4.5%	$\langle \cdot \rangle \times$
C 24:0,1	* < >	at it is				[?; ; ;;	(+>×	+ < x	+>×	+ x
		+ <	X				+)	×		

La première flèche illustre le sens des variations pour la période de 0-8 heures ; la seconde flèche les représente au cours de la période 8-24 heures.

BUS

Le sigle x correspond à la xénopollinisation Le sigle + correspond à l'autopollinisation.

Les cases hachurées témoignent de l'identité de comportement pour une classe de glycosphingolipides entre auto et xénopollinisation.

- Cer et MGCer caractérisés par des taux en acides gras plus faibles après autopollinisation ;

- DGCer, TGCer et TrGCer caractérisés par un profil inverse, c'est-à-dire par des taux en acides gras plus élevés après autopollinisation. Cependant il faut noter le comportement particulier des TGCer intermédiaire entre les deux types décrits Cer - MGCer et DGCer - TrGCer.

### VII - EVOLUTION DE LA REPARTITION DES ACIDES GRAS LONGS EN C20, C22, C23 ET C24

1 - Influence de la durée et du type de pollinisation :

D'une manière générale, on assiste après 8 heures de croisement (compatible ou incompatible), chez les glycosphingolipides neutres, à une augmentation de la teneur de leurs acides gras saturés ou insaturés. Cette observation est en accord avec nos précédents résultats obtenus pour les acides gras des glycosphingolipides neutres totaux (tableau 29a).

Après 24 heures de croisement, auto et xénopollinisation s'opposent de nouveau dans la répartition des acides gras saturés des Cer, MGCer, DGCer et TrGCer et dans celle des acides gras insaturés chez les TGCer. D'une manière générale, la xénopollinisation est caractérisée après 24 heures par une baisse sensible de la teneur de ces acides gras.

## 2 - Influence du génotype après 24 heures de croisement :

L'influence du génotype après 24 heures de croisement est recherchée et le taux des acides gras longs dans les DGCer, TGCer et TrGCer est plus élevé après autopollinisation dans les styles W166K ou chez les MGCer, DGCer et TrGCer des styles de génotype T2U. Il est plus bas chez les MGCer des styles W166K ou chez les TGCer des styles T2U. Nous ne pouvons aller au-delà de ces observations puisque nous n'avons pu analyser les styles vierges de génotype T2U.

	Degré de saturation	Acides gras C20 à C24	Acides gras C18 : 0,1,2,3	Acides gras C14 à C17	Acides gras C10 à C13	Rapport II/PI	Rapport IS/PS	Rapport I/P	Classe de GSI, étudiée	GENOTYPE DU STYLE
		+							Cer	
				×<					MGCer	W
	+××	H X X	+>×	*/			+××	X	DGCer	166к
	+> x	±>x	X			* \ X			TGCer	
				::+ ::::::::::::::::::::::::::::::::::		***			TrGCer	
		+ ×		×	+XX				Cer	
	+>×	× (				+>>×		+>×	MGCer	
				*.×.	***	+> ×	+->-X	+ > x	DGCer	T2U
			+ ×·						TGCer	
)	*						+~~×	+ 	TrGCer	

autopollinisation i × : xenopollinisation

..

TABLEAU 30

TABLEAU RECAPITULATIF DE L'EVOLUTION DE LA DISTRIBUTION DES ACIDES GRAS DANS LES DIVERS

GLYCOSPHINGOLIPIDES EN FONCTION DU GENOTYPE DU STYLE POLLINISE

#### VIII - CONCLUSIONS

En conclusion, nous avons reporté de façon très schématique les résultats des analyses précédentes dans le tableau 30 , à savoir :

- rapport I/P, IS/PS et II/PI ;
- répartition des acides gras courts C10-C13 ;
- répartition des acides gras moyens C14-C17 ;
- répartition des acides gras en C18 ;
- répartition des acides gras longs C20-C24 ;
- et degré de saturation.

Les cases hachurées ou remplies de pointillés, témoignent d'une évolution identique. Les cases laissées en blanc correspondent aux réponses intermédiaires moins nettes. Le comportement des glycosphingolipides permet uniquement chez les styles W166K, de distinguer deux groupes :

- les DGCer et TrGCer ;
- les Cer, MGCer et TGCer,

car ce comportement est moins marqué chez les styles T2U.

Après 24 heures de croisement, deux évolutions seraient possibles, en relation sans doute avec le nombre de résidus osidiques (pair ou impair) contenus dans les divers glycosphingolipides.

Comme nous l'avons constaté précédemment, les variations des compositions en acides gras des glycosphingolipides neutres totaux, illustrées par leurs profils, sont caractérisées par l'augmentation des taux d'acides gras à chaîne longue, au détriment des acides gras à chaîne courte après 8 heures de croisement compatible ou non. Cet accroissement est suivi, après 24 heures de croisement, par l'inversion du profil de répartition pour la xénopollinisation, ou l'accentuation du profil de type 8 heures pour l'autopollinisation.

Ces mêmes variations sont retrouvées au niveau des céramides et des monoglycosylcéramides qui représentent à eux seuls 63 à 86 % des glycosphingolipides neutres. Ces deux glycosphingolipides (Cer, MGCer) impriment donc le sens de répartition des acides gras au niveau des glycosphingolipides totaux. Ce profil de répartition n'est cependant pas général et ne coïncide pas avec celui des DGCer et TrGCer en particulier.

### Il convient donc de différencier deux types de réponse :

86

- celle des céramides, monoglycosylcéramides dont le métabolisme est directement et rapidement touché par la pollinisation, car ils représentent les premiers maillons de la chaîne métabolique ;

- celle des diglycosylcéramides et tétraglycosylcéramides dont le métabolisme sous la dépendance du groupe précédent, est moins rapidement touché par la pollinisation.

### COMPOSITION EN BASES A LONGUE CHAINE

C'est à CARTER (1965) que nous devons la connaissance de l'existence des bases à longue chaîne, à CARTER et à KARLSSON (1971) leur classification selon la longueur de la chaîne carbonée, l'existence, le nombre et la position des doubles liaisons et celle d'éventuels branchements.

L'analyse qualitative et quantitative de ces bases nécessite au préalable :

- la libération des bases suivie d'une extraction sélective ;

- la transformation en DNP dérivés ;

- l'oxydation par le tétraacétate de plomb des DNP dérivés en aldéhydes, puis l'analyse par chromatographie en couche mince et en phase gazeuse ;

- l'oxydation par le permanganate de potassium des aldéhydes en acides gras, puis l'analyse par chromatographie en phase gazeuse.

### 1 - Extraction des bases à longue chaîne et transformation en dérivés dinitrophénylés :

Leur libération a été effectuée selon le protocole de GAVER et SWEELEY (1965). L'extraction sélective de bases à longue chaîne est réalisée par le diéthyléther en milieu alcalin (pH 11). Bien que cette technique rende impossible l'analyse ultérieure de la fraction osidique, nous l'avons cependant retenue car elle assure une libération totale des bases sans formation d'artéfacts tels la 3-0 méthyl-sphingosine et la 5-0 méthyl  $\Lambda_{2}$  sphingosine. Leur instabilité à

## DISTRIBUTION DES BASES A LONGUE CHAINE AU NIVEAU DES CERAMIDES

	Styles vierges	W166K.W166K	W166K.T2U	W186K.W166K	W166K.T2U	T2U.T2U	T2U.W166K	Pollen	Pollen
	W166K	8 heures	8 heures	24 heures	24 hcurcs	24 heures	24 heures	W166K	T2U
A d16:0 - t17:0	3,23	3,30	2,50	5,92	1,50	4,77	7,91	8,17	5,76
B d17:0 - t18:0	20,30	28,31	22,14	24,97	23,72	24,51	38,51	28,82	26,92
C d16:1	46,53	33,95	5,35	20,90	39,27	9,98	5,03	5,03	4,86
D d18:0 - t19:0	2,55	2,09	3,86	3,20	4,10	4,92	4,30	6,79	3,11
E - t18:1	9,88	15,37	30,82	21,07	14,15	30,49	21,81	27,31	29,33
F d19:0 - t20:0	3,49	5,85	14,93	8,68	6,27	8,20	10,10	9,21	11,29
G d18:1	9,11	7,05	11,91	7,76	5,50	10,59	7,02	10,08	13,86
H d20:0	4,90	4,07	8,48	7,49	2,18	6,53	5,23	4,58	4,86
TOTAL	99,99	99,99	99,99	99,99	99,99	99,99	99,99	99,99	99,99
saturées (sat.)	34,47	43,62	51,91	50,26	41,07	48,93	66,13	57,57	51,94
insaturées(insat.	65,52	56,37	48,08	49,73	58,92	51,06	33,86	42,42	48,05
insat. / sat.	1,901	1,292	0,926	0,9894	1,434	1,043	0,512	0,736	0,925

# EVOLUTION DES BASES A LONGUE CHAINE AU NIVEAU DES MONOGLYCOSYLCERAMIDES

	Styles vierges W156K	WI66K.WI66K 8 heures	W166K.T2U 8 heures	W165K.W166K 24 heures	W166K.T2U 24 heures	T2U.T2U 24 heures	T2U.W166K 24 heures	Pollen W166K	Pollen T2U
A a16:0 - ±17:0	0,84	1,46	0,51	0,59	0,31	0,72	0,86	2,97	2,73
B d17:0 - t18:0	2,50	4,27	6,04	1,93	1,68	5,24	3,02	8,96	7,58
C a16:1	7,45	14,75	20,36	10,72	6,40	12,18	11,36	6,76	9,55
D d18:0 - t19:0	0,90	2,29	0,70	0,69	0,66	0,84	1,19	3,56	2,07
E - t18:1	2,08	2,93	0,95	1,05	1,28	1,66	1,78	9,66	9,47
F d19:0 - t20:0	0,75	0,65	0,70	0,35	0,37	1,02	0,81	4,16	3,83
G a18:1	80,07	70,25	68,97	80,44	85,68	75,57	76,42	56,26	59,84
H d20:0	5,40	3,39	1,76	3,72	2,91	. 2,76	4,55	7,66	4,92
TOTAL	99,99	99,99	99,99	99,99	99,99	99 <b>,</b> 99	99,99	99,99	99,99
saturées (sat.)	10,39	12,06	9,71	7,78	5,93	10,58	10,43	27,31	21,13
insaturées(insat.	89,60	67,93	90,28	92,21	94,06	89,41	89,56	72,68	78,86 .
insat. / sat.	8,623	7,291	9,297	11,85	15,86	8,450	8,586	2,661	3.732

DISTRIBUTION DES BASES A LONGUE CHAINE AU NIVEAU DES DIGLYCOSYLCERAMIDES

	Styles vierges W166K	w166K.w166K 8 heures	w156K.T2U 8 heures	w166K.w156K 24 heures	w166K.T2U 24 heures	72U.72U 24 heures	T2U.W166K 24 heures	Pollen W166K	Pollen T2U
					0.0	8) 6	1 10	0.47	1.33
A di6:0 - ti7:0	3,34	2,43	5,40 22 82	96 16	26.0	38.47	41.10	1.6.85	35,56
E dif:0 - t10:0	10,1	12.67	13,45	12,43	13,73	16,02	16,15	15,72	15,52
D 418:0 - \$19:0	44,76	13,58	6,78	77.7	5,20	7.14	6,05	5,22	7,06
E t18:1	7,99	2,18	2,63	3,69	2,12	1,98	1,81	1,95	3,01
F d19:0 - t20:0	5,36	16,35	10,48	14,31	17,65	20,32	18,17	16,94	18,50
G d18:1	23,67	6,97	10,74	10,33	7,99	7,35	8,61	7,78	1,90
5:05b H	7,67	0,04	19,58	17,40	15,87	6,03	6,70	5,06	11,11
TOTAL	66,99	66,66	66*66	66*66	66*66	66*66	66,69	66'66	66*66
saturées (sat.)	66.39	78.17	73,12	73,54	76,15	74,64	73,42	74.54	73,56
incaturées (insat)	33,60	21,82	26,87	26,45	23,84	25,35	26,57	25,45	26,43
insat. / sat.	0,506	0,279	c,367	0,360	0,313	0,340	0,362	0,341	0,359

,

RUS

# DISTRIBUTION DES BASES A LONGUE CHAINE AU NIVEAU DES TRIGLYCOSYLCERAMIDES

	Styles vierges W166K	W166K.W166K 8 heures	W166K.T2U 8 heures	W166K.W166K 24 heures	WI66K.T2U 24 heures	T2U.T2U 24 heures	T2U.W166K 24 heures	Pollen W166K	Potten . T2U
A d16:0 - t17:0	1,84	0,79	2,00	1,49	1,38	1,03	1,10	1,32	1,03
B d17:0 - t18:0	32,41	37,53	39,80	37,54	41,07	35,01	40,14	42,88	36,03
C d 16: 1	21,07	16,81	15,10	16,04	17,34	15,51	17,94	19,72	16,59
D d18:0 - t19:0	5,74	6,16	5,56	6,00	5,76	5,89	7,11	5,37	5,42
E t18:1 -	3,67	2,63	2,30	1,46	1,85	1,08	2,11	1,32	1,56
F d19:0 - t20:0	14,04	19,10	16,92	15,19	17,17	13,58	17,19	14,28	12,73
G d18:1	6,33	10,78	8,43	8,72	7,97	6,06	8.00	5,66	5,91
H d20:0	8,66	4,70	8,05	3,86	3,48	3,24	4,35	3,20	3,13
I d19:1 - t20:1	f,23	1,49	1,83	9,69	3,97	18,59	2,05	6,24	17,59
TOTAL	99,99	99,99	99,99	99,99	99,99	99,99	99,99	99,99	99,99
saturées (sat.)	62,69	68,28	72,33	64,08	68,86	58,75	69,89	67,05	58,34
insaturées(insat.)	37,30	31,71	27,66	35.91	31,13	41,24	30,10	32,94	41,65
insat. / sat.	0,595	0,464	0,382	0,560	0,452	0,702	0,431	0,491	0,714
J									



BUS

8

TABLEAU 35

DISTRIBUTION DES BASES A LONGUE CHAINE AU NIVEAU DES TETRAGLYCOSYLCERAMIDES

Pollen T2U	0,85	37,56 18,77	3,74	1,63	13,55	6,03	3,07	1,76	4,31	5,03	3,64	66*66	63,08	36,91	0,585
Pollen W166K	1,24	33,59 16,78	6,12	2,92	12,14	5,18	.2,57	8,07	2,05	1,90	h, <sup>43</sup>	66,66	57,71	42,28	0,732
72U.W166K 24 heures	0,78	18,99	4,69	1,33	13,24	6,20	1,96	4,41	2,45	1,89	2,07	66,66	65,11	34,88	0,535
72U.T2U 24 heures	0,54	36,26	4,08	1,36	13,96	5,72	3,56	3,72	2,72	3,35	, 16,9	66'66	61,12	38,67	0,635
w166K.T2U 24 heures	1,32	39,31	3,19	2,16	11,93	6,12	1,52	4,55	3,16	1	n,06	66*66	65,43	34,56	0,523
24 heures	0,62	22,23	3,83	71,1	25,57	4,40	2,47	1,97	11,94	11,55	3,78	66,66	12,99	33,23	0,498
w1 ; 6K. T2U & heures	1,59	38,07	8,14	2,81	13,55	5,87	1,68	12,98	traces	1	traces .	99,99	63,03	36,96	0,586
W166K.W166K 8 heures	1,62	47,18	1,47	1,53	15,02	7,12	2,14	2,44	traces	.1	traces	66,99	70,43	29,56	0,419
stytes vierges WI óbk	1,22	37,34	7,59	1,89	17,24	8,28	4,51	4,05	traces	I	traces	99,99	64,90	32,09	0,472
	A d16:0 - t17:0	B d17:0 - t18:0 C d16:1	D d18:0 - t19:0	E - t18:1	F d19:0 - t20:0	G d18:1 0	H d20:0	I d19:1 - t20:1	J d21:0 - t22:0	K d18:2 (7)	L d20:1 - t21:1	TOTAL	saturées (sat.)	insaturées(insat.)	insat. / sat.

l'état libre impose dès leur extraction leur transformation en dérivés dinitrophénylés plus stables par une solution méthanolique de 1-fluoro-2,4-dinitrobenzène (KARLSSON, 1970). Ces DNP dérivés sont ensuite purifiés et identifiés par chromatographie en couche mince (fiche technique n° 13).

### 2 - Analyse des DNP-dérivés des bases (KARLSSON, MARTENSON, 1968) :

Leur analyse par chromatographie en couche mince est précédée par leur transformation en aldéhydes par oxydation au tétraacétate de plomb ce qui, ainsi que nous l'avons précisé, conduit à des chaînes plus courtes par élimination de 3 atomes de carbone (bases trihydroxylées) ou de deux atomes de carbone (bases dihydroxylées).

Les aldéhydes à longue chaîne, issus des bases dinitrophénylées, sont habituellement identifiés par diverses techniques chromatographiques telles par exemple la chromatographie en couche mince, en fonction de la longueur de leur chaîne et de leur degré de saturation (VAN DESSEL, 1977) ou par chromatographie en phase gazeuse.

L'identification des aldéhydes à longue chaîne est ensuite confirmée par l'analyse des acides gras homologues obtenus après oxydation des aldéhydes par le permanganate de potassium. Une telle oxydation peut être effectuée directement sur le mélange d'aldéhydes saturés ou désaturés, ou après hydrogénation catalytique. Cette analyse n'ayant pour but essentiel que la confirmation de l'identité des aldéhydes, nous avons directement oxydé le mélange aldéhydique par le permanganate sans hydrogénation catalytique préalable.

Les résultats obtenus pour les divers glycosphingolipides sont reportés tableaux 31,32,33,34 et 35.

Habituellement, on dose les bases à longue chaîne préférentiellement par leur produits d'oxydation, aldéhydes ou acides gras. Or, l'oxydation des bases entraîne, selon leur structure, une scission des molécules par perte de 2 ou 3 atomes de carbone. Les bases dihydroxylées et trihydroxylées homologues à n + 1 atomes de carbone conduisant à la formation d'un même produit d'oxydation, aussi serait-il indispensable de séparer ces bases di et trihydroxylées par chromatographie de leurs dérivés dinitrophénylés avant leur dosage. Mais, les faibles quantités de matériel et les faibles concentrations de glycosphingolipides dans les extraits, ne permettent pas de multiplier à l'infini les étapes chromatographiques. En effet, chacune d'elles entraîne la perte d'un pourcentage non négligeable de produit (20 % environ) par fixation sur les colonnes. Aussi, comme bien des auteurs le préconisent, les bases seront analysées sans séparation préalable sous forme de leurs produits d'oxydation. Les résultats que nous présentons dans le tableau présenté ci-dessous, correspondent par le dosage des aldéhydes, à celui des bases di et trihydroxylées non séparées, précurseurs probables de ces aldéhydes.

Bases à longue chaine		aldéhydes
A héxadécasphinganine hydroxyheptadécasphinganine	d16 : 0 t17 : 0	C14 : O tétradécanal
B héptadécasphinganine hydroxysphinganine	d17 : 0 t18 : 0	C15 : O pentadécanal
C hexadécasphingénine	d16 : 1	C14 : 1 tétradécénal
D sphinganine hydroxynonadécasphinganine	d18 : 0 t19 : 0	C16 : 0 héxadécanal
E héptadécasphingénine hydroxysphingénine	d17 : 1 t18 : 1	C15 : 1 pentadécénal
F nonadécasphinganine hydroxyeicosasphinganine	d19 : 0 t20 : 0	C17 : O heptadécanal
G sphingénine	d18 : 1	C16 : 1 héxadécénal
H eicosasphinganine	d20 : 0	C18 : 0 octodécanal
I nonadécasphingénine	d19 : 1	C17 : 1 héptadécénal
J ?	?	C19 : 0 nonadécanal
K sphingadiénine ?	d18 : 2 ?	C16 : 2 héxadécadienal
L eicosasphingénine ?	d20 : 1 ?	C18 : 1 octodécénal

88



A	:	d16	:	0,	t17	:	0
В	:	d17	:	0,	t18	:	0
С	:	d16	:	1			
D	:	d18	:	0,	t19	:	0
Ε	:	d17	:	1,	<i>t</i> 18	:	1
F	:	d19	:	0,	t20	:	0
G	:	d18	:	1			
Н	:	d20	:	0			
I	:	d19	:	1			
J	:	?					
К	:	d18	:	2,	?		
L	:	d20	:	1,	?		

Styles vierges W166K Pollen W166K Pollen T2U Styles W166K.W166K, 8 h. Styles W166K.T2U, 8 h. Styles W166K.W166K, 24 h. Styles W166K.T2U, 24 h. Styles T2U.T2U, 24 h. Styles T2U.W166K, 24 h.

# DISTRIBUTION DES BASES A LONGUE CHAINE DANS LES CERAMIDES

Afin d'aboutir à un schéma de la répartition des bases à longue chaîne dans les glycosphingolipides, leur distribution a été recherchée dans chacune de leur classe : céramides, mono, di, tri et tétraglycosylcéramides. C'est ce mode d'analyse, différent de celui qui a été précédemment employé dans le cas des acides gras, que nous allons envisager.

#### I - BASES A LONGUE CHAINE ET CERAMIDES

Après identification et dosage des bases à longue chaîne, les résultats ont été examinés en fonction de :

- la composition en bases à longue chaîne des pollens et du style vierge et de leurs génotypes respectifs ;

- l'évolution de la distribution en fonction du type et du temps de pollinisation ;

- l'évolution de la distribution selon le génotype du style vierge qui sera pollinisé.

## 1 - Comparaison des compositions en bases à longue chaîne des pollens et des styles vierges :

Nous avons comparé tout d'abord les pollens entre eux (tableau 31). Leur composition est originale par leur richesse respective en héptadécasphinganine (d17 : 0) et hydroxysphinganine (t18 : 0) pour le pollen W166K ou en héptadécasphingénine (d17 : 1) et hydroxysphingénine (t18 : 1) pour le pollen T2U.

Les styles vierges W166K sont eux, caractérisés principalement par la présence d'héxadécasphingénine (d16 : 1). A ce propos, rappelons que l'hydroxyheptadécasphingénine (t17 : 1) n'a encore jamais détectée. Ainsi, selon les résultats présentés figure 25 pollens et styles vierges sont très éloignés par leur composition respective en bases à longue chaîne. Cette hétérogénéité quantitative et qualitative est essentiellement caractérisée par l'état plus saturée des bases polliniques et par l'état de désaturation qui marque les bases stylaires.

# 2 - Pollinisations et bases à longue chaîne ;

L'analyse des relations existant entre pollinisations et bases à longue chaîne est envisagée après xénopollinisation et autopollinisation selon des durées variables de 0 à 8 heures et de 8 à 2<sup>4</sup> heures.

a) <u>xénopollinisation</u>. Après 8 heures de pollinisation compatible, la diminution des groupes A et C (bases d16 : 0, t17 : 0 et d16 : 1) et l'augmentation des autres groupes contribuent à la diminution quantitative des bases désaturées des styles pollinisés par rapport aux styles vierges.

La xénopollinisation après 24 heures, est suivie comme nous l'avions précédemment observé au niveau des acides gras, de l'inversion des profils de la distribution des bases, c'est-à-dire augmentation des teneurs en bases à chaînes relativement plus courtes (d16 : 0, t17 : 0 et d16 : 1) et la diminution quantitative des autres bases.

Il convient de souligner le parallèle entre l'évolution provoquée par la xénopollinisation au niveau de la distribution des bases et des acides gras dans les glycosphingolipides. L'analyse du comportement des hexadécasphingénines est également très intéressante. Ces bases appartiennent spécifiquement aux styles (46,5 %) et sont pratiquement absentes des pollens (environ 5 %). Or, après 8 heures de xénopollinisation, leur teneur diminue nettement puisque les glycosphingolipides des styles ne renferment plus qu'environ 5 % de ces bases. Cette valeur correspond sensiblement à celle présentée par les glycosphingolipides des pollens et naturellement par les lipides du pollen T2U.

Ceci permet de penser que dès le début de la pollinisation, un métabolisme nouveau est induit qui semble être de type pollinique. Mais ultérieurement, dans le second temps de la pollinisation, le caractère transitoire de ce métabolisme pollinique apparaît car il redevient à caractère stylaire : fortes valeurs du taux d'hexadécasphingénine et profil de distribution qui, en dépit de quelques perturbations, est identique à celui des styles vierges.

b) <u>autopollinisation</u>. Le profil de distribution des bases est également perturbé par l'autopollinisation mais l'évolution observée est plus difficilement schématisable.

EVOLUTION DES BASES A LONGUES CHAINES DES CERÀMIDES APRES POLLINISATIONS

	DEGR	DEGRE DE SATURATION		DEGRE DE BASES DE TYPE STYLAIRE		BASES DE TYPE POLLINIQUE						
	SATUR			: 1	d 16 t 17	: 0 : 0	d 17 t 18	: 0 : 0	d 17 t 18	: 1 : 1	d 19 t 20	: 0 : 0
XENOPOLLINISATION W166K.T2U	10			1	1	1	1	1	1	1	1	1
AUTOPOLLINISATION W166K.W166K	1	1	1	1	1	1	Å	1	1	1	1	1
COMPARAISON A 8 H ENTRE AUTO ET XENOPOLLINISATION		,	+	> X	+>	»X	+>	>X	+<	<*X	+<	<×
COMPARAISON A 24 H ENTRE AUTO ET XENOPOLLINISATION			· + ·	< ×	+>	>X	+>	×X	+>	>X	+>	>'X

A - Classification des bases et schéma d'évolution

La première flèche illustre le sens des variations pour la période 0-8 heures la seconde flèche les représente au cours de la période 8-24 heures. le sigle x correspond à la xénopollinisation

le sigle + correspond à l'autopollinisation

Schéma hypothétique des diverses inductions métaboliques B -



Après 8 heures de croisement, comme dans le cas de la xénopollinisation, on note cependant une diminution du taux d'hexadécasphingénine bien que celui-ci soit moins prononcé et une augmentation des autres bases à l'exception de la sphingosine et de l'éicosasphinganine.

Après 24 heures de croisement incompatible, le taux d'hexadécasphingénine diminue toujours, cependant que le taux des autres bases s'élève de façon constante.

c) <u>en résumé</u>, la comparaison de la composition en bases en fonction de la pollinisation compatible ou incompatible, met en évidence par leur variation l'opposition entre la xénopollinisation et l'autopollinisation, après 2<sup>4</sup> heures de croisement. En effet, après l'induction dans un premier temps d'un métabolisme à caractère pollinique, l'autopollinisation semble intervenir au niveau des céramides en inhibant toute "*transmission*" qui assurerait le passage d'un métabolisme à caractère pollinique vers un métabolisme intermédiaire favorable à la fécondation. C'est donc au bout de 2<sup>4</sup> heures que les divergences entre les deux pollinisations seront les plus apparentes. Nous avons par souci de clarté, résumé dans le tableau 36a les évolutions qui nous paraîssent essentielles, c'est-à-dire :

- étude du degré de saturation, de la distribution de l'hexadécasphingénine et celle de la distribution de l'hydroxysphingénine.

# 3 - Distribution en fonction du génotype :

Comme l'opposition entre les comportements après auto et xénopollinisation est maximale après 24 heures de croisement, nous avons étudié la distribution des bases en fonction du sens de croisement et du génotype de la plante pollinisée. Il semble également que l'auto et la xénopollinisation révèlent deux phénomènes opposés, cependant il nous est impossible de conclure plus amplement car nous ne possédons actuellement aucune donnée sur les styles vierges T2U.



26

FIGURE



A	:	d16	:	0,	t17	:	0
В	:	d17	:	0,	t18	:	0
С	:	d16	:	1			
D	:	d18	:	0,	t19	:	0
Ε	:	d17	:	1,	t18	:	1
F	:	d19	:	0,	t20	:	0
G	:	d18	:	1			
Н	:	d20	:	0			
I	:	d19	:	1			
J	:	?					
κ	:	d18	:	2,	?		
L	:	d20	:	1,	?		

	Styles	vierges W166K
	Pollen	W166K
	Pollen	T2U
	Styles	W166K.W166K, 8 h.
$\bigotimes$	Styles	W166K.T2U, 8 h.
	Styles	W166K.W166K, 24 h.
	Styles	W166K.T2U, 24 h.
:::;	Styles	T2U.T2U, 24 h
	Styles	T2U.W166K, 24 h.

#### II - BASES A LONGUE CHAINE ET MONOGLYCOSYLCERAMIDES

Les résultats obtenus sont reportés figure 26 en fonction de la nature stylaire ou pollinique des extraits, de la pollinisation compatible ou incompatible des styles W166K, et enfin du génotype du style pollinisé.

La répartition des bases au niveau des monoglycosylcéramides est fondamentalement différente de celle qui a été précédemment observée chez les céramides. En effet, si ces céramides étaient caractérisés par les groupes B (heptadécasphinganine, hydroxysphinganine) ; C (héxadécasphingénine) et E (heptadécasphingénine, hydroxysphingénine), les MGCer sont remarquables par ces mêmes groupes, B C et E, et les fortes teneurs en bases du groupe C (sphingosine ou sphingénine).

Les pollens se caractérisent ici encore par une richesse relative en heptadécasphinganine, hydroxysphingosine (groupe B) et en heptadécasphingénine, hydroxysphingénine (groupe E). La sphingénine (groupe G) quoique abondante dans les pollens (57 % environ), caractérise davantage les styles (80 %).

Il nous a paru intéressent d'analyser l'évolution de ces groupes B C E G en fonction de la pollinisation.

1 - Distribution en fonction du temps et du mode de pollinisation : a) <u>la xénopollinisation</u>. Elle affecte naturellement le profil de distribution des bases, par rapport à celui des styles vierges. Comme au niveau des céramides, la période 0-8 heures est marquée par l'augmentation des bases de type pollinique (groupes B et C en particulier) et par une diminution des bases de type stylaire (groupe G).

Après 24 heures de pollinisation, il y a inversion des profils de distribution : la baisse des bases de type pollinique sera compensée par l'augmentation des autres bases de type stylaire.

La désaturation augmente progressivement, en effet la perte en sphingénine est compensée par l'augmentation des teneurs en hexadécasphingénine après 8 heures de croisement puis inversement après 24 heures, la diminution de l'hexadécasphingénine est suivie par l'augmentation des teneurs en sphingénine.

92

EVOLUTION DES BASES A LONGUES CHAINES DES MONOGLYCOSYLCERAMIDES APRES POLLINISATION

	DEGRE DE	BASES DE TYPE STYLAIRE	BASES DE TYPE POLLINIQUE			
	SATURATION		d 17 : 0 t 18 : 0	d 16 : 1		
XENOPOLLINISATION W166K.T2U	11					
AUTOPOLLINISATION W166K.W166K	11		/ \			
COMPARAISON A 8 H ENTRE AUTO ET XENOPOLLINISATION	+ <x< td=""><td>+&gt;X</td><td>+<x< td=""><td>+&lt; X</td></x<></td></x<>	+>X	+ <x< td=""><td>+&lt; X</td></x<>	+< X		
COMPARAISON A 24 H ENTRE AUTO ET XENOPOLLINISATION	+< X	+< X	+>X	+ >X		

A - Classification des bases et schéma d'évolution

La première flèche illustre le sens des variations pour la période 0-8 heures la seconde flèche les représente au cours de la période 8-24 heures. le sigle x correspond à la xénopollinisation le sigle + correspond à l'autopollinisation

B - Schéma hypothétique des diverses inductions métaboliques



b) <u>l'autopollinisation</u>. Elle entraîne les mêmes variations que la xénopollinisation. Cependant, au niveau des bases mineures des groupes A D E et F nous assistons, là où il y a diminution des teneurs pour un mode de pollinisation, a une augmentation pour l'autre et inversement. Les variations relevées dans le cas des groupes B C et G s'effectuent dans le même sens ainsi que nous pouvons le constater dans le tableau 37a.

Dans la première partie du tableau nous avons reporté le sens des variations pour chacun des 4 paramètres retenus, la première flèche correspond à la période 0-8 heures, la seconde à la période 8-24 heures. Dans la seconde partie du tableau, nous avons reporté après 8 et 24 heures de croisement, les dominances des pollinisations l'une par rapport à l'autre, l'autopollinisation étant représentée par le sigle + et la xénopollinisation par le sigle x.

Nous constatons que les variations ont lieu qualitativement dans le même sens mais qu'elles ne présentent pas la même intensité. Au bout de 8 heures de croisement, les taux de hexadécasphingénine et de hydroxysphinganine augmentent plus vite en xénopollinisation qu'en autopollinisation. De même, la perte de sphinganine est plus importante en xénopollinisation.

La xénopollinisation atteint plus rapidement l'état de métabolisme de type pollinique, elle le quitte d'ailleurs également plus rapidement que l'autopollinisation pour retrouver l'état métabolique intermédiaire de type stylaire. C'est ce que nous avons essayé de schématiser tableau 37b.

# 2 - Distribution en fonction du génotype :

Les profils de distribution des bases, en fonction de la pollinisation (compatible ou incompatible) et en fonction du génotype (W166K ou T2U) du style pollinisé sont semblables à une exception près, le groupe A, soit l'hexadécasphinganine et l'hydroxyheptadécasphinganine. DISTRIBUTION DES BASES A LONGUE CHAINE DANS LES DIGLYCOSYLCERAMIDES



d16:0, t17:0A : BCDEFG d17 : 0, t18 : 0 : d16 : 1 : d1 8 : 0, t19 : 0 : d17 : 1, t18 : 1 : d19 : 0, t20 : 0 : d18 : 1 : Н d20 : : 0 I d19 : 1 : J ? : K d18 : 2, ? : ? L d20 : 1, :

. .

 Styles vierges W166K

 Pollen W166K

 Pollen T2U

 Styles W166K.W166K, 8 h.

 Styles W166K.T2U, 8 h.

 Styles W166K.T2U, 8 h.

 Styles W166K.T2U, 8 h.

 Styles W166K.T2U, 24 h.

 Styles T2U.T2U, 24 h.

 Styles T2U.W166K, 24 h.

FIGURE 27

#### III - BASES A LONGUE CHAINE ET DIGLYCOSYLCERAMIDES

Les résultats concernant la distribution des bases dans les DGCer sont reportés figure 27 en fonction :

- de la nature stylaire ou pollinique des extraits ;

- de la durée de la pollinisation compatible ou incompatible ;

- et du génotype du style pollinisé.

1 - Distribution au niveau des pollens et des styles :

Les DGCer des styles vierges W166K sont caractérisés par leur richesse en bases appartenant aux groupes :

- D : sphinganine, hydroxynonadécasphinganine ;
- E : heptadécasphingénine, hydroxysphingénine ;
- G : sphingénine.

Les DGCer des pollens T2U et W166K s'éloignent des styles vierges par la nature et par les teneurs élevées en bases des groupes :

- B : heptadécasphinganine, hydroxysphinganine ;
- C : hexadécasphingénine ;
- F : nonadécasphinganine, hydroxyeicosasphinganine.

Nous envisagerons donc l'évolution de la distribution de ces groupes de bases en fonction du temps et du type de croisement.

2 - Distribution en fonction du temps et du mode de pollinisation :

a) <u>la xénopollinisation</u>, entraîne la diminution des bases appartenant aux groupes D E et G qu'en raison de leur importance dans le style nous avons qualifiés de stylaires et l'augmentation concomitante des teneurs en bases des groupes B C et F qualifiés de "polliniques". Ce profil déjà net dès la huitième heure de croisement, s'accentue encore après 24 heures.

94

EVOLUTION DES BASES A LONGUES CHAINES DES DIGLYCOSYLCERAMIDES APRES POLLINISATIONS

BASES DE TYPE POLLINIQUE				BASES DE TYPE STYLAIRE		
d17 : 0 t18 : 0	d16 : 1	d19 : 0 t20 : 0		d18 : 0 t19 : 0	t18 : 1	d18 : 1
11	11	11	XENOPOLLINISATION W166K.T2U	1		
1	11	1	AUTOPOLLINISATION W166K.W166K	)	$\mathbf{N}$	
+ > X	+ >X	+>X	COMPARAISON A 8 H ENTRE AUTO ET XENOPOLLINISATION	+>X	+ <x< td=""><td>+<x< td=""></x<></td></x<>	+ <x< td=""></x<>
+ <x< td=""><td>+ <x< td=""><td>+<x< td=""><td>COMPARAISON A 24 H ENTRE AUTO ET XENOPOLLINISATION</td><td>+&gt;X</td><td>+ &gt;X</td><td>+&gt;X</td></x<></td></x<></td></x<>	+ <x< td=""><td>+<x< td=""><td>COMPARAISON A 24 H ENTRE AUTO ET XENOPOLLINISATION</td><td>+&gt;X</td><td>+ &gt;X</td><td>+&gt;X</td></x<></td></x<>	+ <x< td=""><td>COMPARAISON A 24 H ENTRE AUTO ET XENOPOLLINISATION</td><td>+&gt;X</td><td>+ &gt;X</td><td>+&gt;X</td></x<>	COMPARAISON A 24 H ENTRE AUTO ET XENOPOLLINISATION	+>X	+ >X	+>X

A - Classification des bases et schéma d'évolution

La première flèche illustre le sens des variations pour la période 0-8 heures la seconde flèche les représente au cours de la période 8-24 heures. le sigle x correspond à la xénopollinisation le sigle + correspond à l'autopollinisation

B - Schéma hypothétique des diverses inductions métaboliques



DISTRIBUTION DES BASES A LONGUE CHAINE DANS LES TRIGLYCOSYLCERAMIDES

28

FIGURE



4	:	d16	:	0,	<i>t</i> 17	:	0
в	:	d17	:	0,	t18	:	0
2	:	d16	:	1			
)	:	d18	:	0,	<i>t</i> 19	:	0
5	:	d17	:	1,	t18	:	1
-	:	d1 9	:	0,	t20	:	0
3	:	d18	:	1			
Ч	:	d20	:	0			
I	:	d19	:	1			
J	:	?					
K	:	d18	:	2,	?		
L	:	d20	:	1,	?		

 Styles vierges W166K

 Pollen W166K

 Pollen T2U

 Styles W166K.W166K, 8 h.

 Styles W166K.T2U, 8 h.

 Styles W166K.T2U, 8 h.

 Styles W166K.T2U, 24 h.

 Styles T2U.T2U, 24 h.

 Styles T2U.W166K, 24 h.

b) <u>l'autopollinisation</u>, comme la xénopollinisation, est suivie après 8 heures de croisement par l'installation d'un profil dit "pollinique". Cependant, après 24 heures, une inversion se manifeste et un nouveau profil de type "stylaire" se développe.

Nous avons donc résumé dans le tableau 38a,b ces deux comportements compatible et incompatible, avec les mêmes spécifications que page 93 en ce qui concerne la signification des flèches et des sigles. Ainsi, la xénopollinisation et l'autopollinisation tendent toutes deux vers un état de type pollinique. L'autopollinisation y parvient plus vite que la xénopollinisation comme le montrent, après 8 heures de croisement, les teneurs plus élevées en bases des groupes B C et F et plus faibles en bases des groupes E et G. Au bout de 24 heures, la xénopollinisation présente des taux toujours élevés en bases de type "pollinique", identiques à ceux obtenus après 8 heures de croisement incompatible . Au contraire, l'autopollinisation entraîne un retour vers un état de type stylaire. Ce sont ces différences de comportement que nous avons essayé de schématiser dans le tableau 38b.

# 3 - Distribution en fonction du génotype :

Bien que nous ne puissions pas aller au-delà des résultats obtenus en fonction du mode de croisement (compatible ou non) et du génotype du style pollinisé (W166K ou T2U), puisque nous n'avons pu analyser les styles vierges T2U, cependant il est possible de souligner l'identité de la répartition des bases dans les groupes A B C D et E en fonction de la pollinisation, ainsi que l'opposition entre les deux types de pollinisation illustrée par les bases des groupes F G et H.

#### IV - BASES A LONGUE CHAINE ET TRIGLYCOSYLCERAMIDES

Les résultats concernant la distribution des bases dans les TGCer sont reportés figure 28 en fonction ici aussi de l'origine pollinique ou stylaire des extraits, de la pollinisation compatible ou incompatible de la durée du croisement ainsi que du génotype du style pollinisé. DISTRIBUTION DES BASES A LONGUE CHAINE DANS LES TETRAGLYCOSYLCERAMIDES



A	:	d16	:	0,	<i>t17</i>	:	0
B	:	d17	:	0,	<i>t</i> 18	:	0
С	:	d16	:	1			
D	:	d18	:	0,	t19	:	0
Ē	:	d17	:	1,	<i>t</i> 18	:	1
F	:	d19	:	0,	<i>t</i> 20	:	0
G	:	d18	:	1			
Н	:	d20	:	0			
I	:	d19	:	1			
J	:	?					
K	:	d18	:	2,	?		
1	:	d20	:	1,	?		

 Styles vierges W166K

 Pollen W166K

 Pollen T2U

 Styles W166K.W166K, 8 h.

 Styles W166K.T2U, 8 h.

 Styles W166K.T2U, 8 h.

 Styles W166K.T2U, 24 h.

 Styles T2U.T2U, 24 h.

 Styles T2U.W166K, 24 h.

FIGURE 29

1 - Distribution au niveau des pollens et des styles vierges : Les profils de répartition des bases dans les TGCer des styles vierges W166K ainsi que des pollens W166K et T2U, présentent de grandesressemblances Cependant, les extraits des styles W166K se distinguent des extraits polliniques par leur richesse en bases appartenant aux groupes :

- C : hexadécasphingénine ;
- E : heptadécasphingénine, hydroxysphingénine ;

- H : eicosasphinganine.

Les pollens W166K et T2U sont caractérisés par la présence des bases du groupe B soit l'heptadécasphinganine et l'hydroxysphinganine. De plus, le pollen T2U apparaît également riche en nonadécasphingénine (groupe I).

2 - Distribution en fonction du mode et du temps de pollinisation : Dans le tableau 39 nous avons indiqué par des flèches le sens des variations pour chaque groupe de bases en fonction de leur prépondérance dans les extraits stylaires ou polliniques. Nous y avons également reporté les résultats de la comparaison des deux pollinisations compatible ou incompatible, l'une par rapport à l'autre, après 8 et 24 heures de croisement.

Dans le cas des TGCer mais bien que cela soit moins net, nous assistons dans un premier temps (0-8 heures) au développement d'un profil de type "pollinique" caractérisé par une diminution des bases de type stylaire. Ce profil de type pollinique est relativement plus vite installé dans le cas de l'autopollinisation.

Dans la seconde période, l'autopollinisation est caractérisée par le renversement de la situation précédente et par l'installation d'un profil de répartition de type stylaire. Ces faits sont nettement plus faibles en xénopollinisation.

1

EVOLUTION DES BASES A LONGUES CHAINES DES TRIGLYCOSYLCERAMIDES APRES POLLINISATIONS

BASES DE TYPE POLLINIQUE			-	BASES DE TYPE STYLAIRE		IRE
d17 : 0 t18 : 0	d19 : 0 t20 : 0	d18 : 1		d16 : 1	t18 : 1	d20 : 0
11	11		XENOPOLLINISATION W166K.T2U			
/ Ξ	1		AUTOPOLL INISATION W166K.W166K	Je Je	\	
+ <x< td=""><td>+&gt;X</td><td>+&gt;X</td><td>COMPARAISON A 8 H ENTRE AUTO ET XENOPOLLINISATION</td><td>+&gt;X</td><td>+&gt;X</td><td>+<x< td=""></x<></td></x<>	+>X	+>X	COMPARAISON A 8 H ENTRE AUTO ET XENOPOLLINISATION	+>X	+>X	+ <x< td=""></x<>
+ <x< td=""><td>+<x< td=""><td>+&gt;X</td><td>COMPARAISON A 24 H ENTRE AUTO ET XENOPOLLINISATION</td><td>+<x< td=""><td>+<x< td=""><td>+&gt;X</td></x<></td></x<></td></x<></td></x<>	+ <x< td=""><td>+&gt;X</td><td>COMPARAISON A 24 H ENTRE AUTO ET XENOPOLLINISATION</td><td>+<x< td=""><td>+<x< td=""><td>+&gt;X</td></x<></td></x<></td></x<>	+>X	COMPARAISON A 24 H ENTRE AUTO ET XENOPOLLINISATION	+ <x< td=""><td>+<x< td=""><td>+&gt;X</td></x<></td></x<>	+ <x< td=""><td>+&gt;X</td></x<>	+>X

A - Classification des bases et schéma d'évolution

La première flèche illustre le sens des variations pour la période 0-8 heures la seconde flèche les représente au cours de la période 8-24 heures. le sigle x correspond à la xénopollinisation le sigle + correspond à l'autopollinisation

B - Schéma hypothétique des diverses inductions métaboliques



# 3 - Distribution en fonction du génotype :

A l'exception de quelques bases appartenant aux groupes A G et H, l'examen de la figure 28 indique que le génotype du style pollinisé n'influence pas les réponses des styles quelle que soit la pollinisation compatible ou incompatible.

## V - BASES A LONGUE CHAINE ET TETRAGLYCOSYLCERAMIDES

# 1 - Identification :

L'identification des bases à longue chaîne constitutives des TrGCer a posé certains problèmes. En effet, il est apparu dans les extraits polliniques 3 pics nommés J K et L et correspondant à des aldéhydes caractérisés par des temps de rétention excessivement longs.

Le premier pic J possèdait un temps de rétention s'alignant parfaitement sur la droite correspondant aux aldéhydes homologues saturés quand on porte le logarithme de leur temps de rétention en fonction de la longueur de la chaîne. Ce pic coïncidait avec un aldéhyde à 19 atomes de carbone, qui ne peut dériver que d'une base en d21 : 0 ou t22 : 0. Après oxydation par le permanganate de potassium, un acide gras en C19 : 0 est présent sur le chromatogramme.

Le pic L correspond à un aldéhyde monoinsaturé provenant probablement de l'éicosasphingénine.

Le pic K correspondait à un aldéhyde caractérisé par une longueur de chaîne équivalente à 19,25 atomes de carbone. Il ne s'alignait ni sur la droite reliant les aldéhydes homologues saturés, ni sur celle reliant les aldéhydes homologues monoinsaturés. Il pouvait donc s'agir soit :

- d'un aldéhyde diinsaturé ;

- d'un aldéhyde possédant un groupement méthyl branché.

Après oxydation par le permanganate de potassium, il est apparu sur les chromatogrammes un pic correspondant à l'acide palmitolénique (C16 : 2). Le pic pourrait provenir de la sphingadiénine. Cependant, comme nous ne possédons pas de témoins :aldéhydes branchés, bases méthylées ou acides gras, nous ne pouvons pas avec certitude identifier les pics J et K. L'identification de ces bases à longue chaîne nécessiterait l'emploi de la spectrométrie de masse et en infrarouge. Nous ne pouvons donner, en ce qui concerne ces deux pics, qu'un faisceau d'indications les déterminant. Le pic J correspond probablement à une base à groupement méthyl branché, puisqu'aucune base de type d21 : O n'a été mise en évidence ; le pic K correspond à la sphingadiénine non identifiée à notre connaissance chez les végétaux.

Nous nous bornerons, en ce qui concerne ces pics, à les désigner par les lettres J, K et L.

#### 2 - Distribution au niveau des pollens et des styles vierges :

Les résultats concernant la répartition des bases dans les TrGCer sont reportés figure 29 avec les mêmes spécifications que précédemment. Comme au niveau des TGCer, il est également plus difficile de caractériser pollen ou style par un type de base. Cependant, de fortes présomptions laissent penser que les bases correspondant aux groupes J K et L sont essentiellement de type pollinique ; les styles vierges W166K étant eux caractérisés par les bases des groupes D, F, G, H c'est-à-dire par :

- les sphinganine et hydroxynonadécasphinganine (D);

- les nonadécasphinganine et hydroxyeicosasphinganine (F) ;

- la sphingénine (G);
- et l'eicosasphinganine (H).

### 3 - Distribution en fonction du mode et du temps de pollinisation :

Dans le tableau 40a,b, nous avons reporté les variations de distribution des bases induites par la xéno et l'autopollinisation ainsi que la relativité des aspects quantitatifs dans les deux croisements. Les sigles utilisés sont les mêmes que précédemment.
#### TABLEAU 40

# EVOLUTION DES BASES A LONGUES CHAINES DES TETRAGLYCOSYLCERAMIDES APRES POLLINISATIONS

BASES DE TYPE POLLINIQUE					•	BASES DE TYPE STYLAIRE				
d16:0 t17:0	d17:0 t18:0	J	К	L		d18 : 0 t19 : 0	d19 : 0 t20 : 0	d18 : 1	d20 : 0	
$\land$	11	_1	_1	_1	XENOPOLLINISATION W166K.T2U	/ =	1.1	∖≡	λΞ	
$\land$	$/ \setminus$	_1	_1	_1	AUTOPOLLINISATION W166K.W166K	11	\ /	11	<b>→</b> Ξ	
+ <x< td=""><td>+&gt;x</td><td></td><td></td><td>т. </td><td>COMPARAISON A 8 H ENTRE AUTO ET XENOPOLLINISATION</td><td>.+&lt;×</td><td>+&gt;×</td><td>+&gt;X</td><td>+&gt;X.</td></x<>	+>x			т. 	COMPARAISON A 8 H ENTRE AUTO ET XENOPOLLINISATION	.+<×	+>×	+>X	+>X.	
+ <x< td=""><td>+<x< td=""><td>&gt;×</td><td>+&gt;x</td><td>+<x< td=""><td>COMPARAISON A 24 H ENTRE AUTO ET XENOPOLLINISATION</td><td>+&gt;X</td><td>+&gt;X</td><td>+<x< td=""><td>+ &gt;X</td></x<></td></x<></td></x<></td></x<>	+ <x< td=""><td>&gt;×</td><td>+&gt;x</td><td>+<x< td=""><td>COMPARAISON A 24 H ENTRE AUTO ET XENOPOLLINISATION</td><td>+&gt;X</td><td>+&gt;X</td><td>+<x< td=""><td>+ &gt;X</td></x<></td></x<></td></x<>	>×	+>x	+ <x< td=""><td>COMPARAISON A 24 H ENTRE AUTO ET XENOPOLLINISATION</td><td>+&gt;X</td><td>+&gt;X</td><td>+<x< td=""><td>+ &gt;X</td></x<></td></x<>	COMPARAISON A 24 H ENTRE AUTO ET XENOPOLLINISATION	+>X	+>X	+ <x< td=""><td>+ &gt;X</td></x<>	+ >X	

A - Classification des bases et schéma d'évolution

La première flèche illustre le sens des variations pour la période 0-8 heures la seconde flèche les représente au cours de la période 8-24 heures. le sigle x correspond à la xénopollinisation le sigle + correspond à l'autopollinisation

B - Schéma hypothétique des diverses inductions métaboliques



L'examen du tableau 40a montre que l'autopollinisation et la xénopollinisation sont suivies de la disparition du profil à caractère stylaire de la distribution des bases à longue chaîne où les groupes de bases D F G et H étaient bien représentés. Les deux pollinisations sont essentiellement illustrées par l'installation progressive suivie de l'acquisition en 24 heures d'un profil de distribution de type pollinique. Ce comportement est schématisé dans le tableau 40b.

#### VI - CONCLUSION

Ainsi, cette étude nous a permis un net enrichissement de nos connaissances sur la constitution des pollens et des styles en glycosphingolipides. Les pollens sont uniformément caractérisés par une richesse en heptadécasphinganine et hydroxysphinganine (phytosphingosine). Par contre, les styles, d'une manière moins constante, sont caractérisés par la présence de sphingénine (sphingosine).

La pollinisation (compatible et incompatible) entraîne dans le style pollinisé une variation du profil de répartition des bases au niveau de chaque glycosphingolipide neutre. De 0 à 8 heures, la distribution des bases devient à caractère pollinique; par contre, de 8 à 24 heures, l'autopollinisation et la xénopollinisation s'éloignent l'une de l'autre par certains caractères. Ainsi, le profil observé après 8 heures de xénopollinisation s'inverse et présente à nouveau un profil de type stylaire chez les Cer et MGCer. L'autopollinisation de son côté sera illustrée par cette évolution (retour après 24 heures de croisement vers le profil de type stylaire) au niveau des DCCer et TGCer. Chez les TrGCer, xénopollinisation et autopollinisation induisent un profil pollinique difficile à définir et le temps de croisement ne fait qu'accentuer l'installation de ce profil.

Comme pour les acides gras, la distribution des bases à longue chaîne dans les divers glycosphingolipides neutres évolue en deux phases dûes à :

### FIGURE 30

SCHEMA HYPOTHETIQUE DE L'EVOLUTION DES BASES A LONGUES CHAINES EN FONCTION DU TYPE DE POLLINISATION



+ = autopollinisation



- la réponse rapide des précurseurs (Cer - MGCer) lors de la pollinisation ;
- la réponse lente des DGCer et TGCer ;

- au retard métabolique des TrGCer.

Si on admet que la composition en bases à longue chaîne des di et triglycosylcéramides après 8 ou 24 heures de croisement est représentative de celle des céramides, ces derniers étant considérés comme leur précurseur métabolique, pendant une phase antérieure à 8 et 24 heures, il est possible de schématiser une fois de plus l'évolution du métabolisme des glycosphingolipides après auto et xénopollinisation. Sur la figure 30 sont reportées 3 zones correspondant aux états métaboliques à caractère stylaire, pollinique ou stylaire modifié. Le comportement des glycosphingolipides neutres, après auto et xénopollinisation, comporte 3 phases :

- <u>une phase 1</u> au cours de laquelle est induit le passage d'un état métabolique de "type stylaire" vers un état métabolique de "type pollinique". Cette induction est plus précoce et rapide dans le cas de l'autopollinisation.

- <u>une phase 2</u> au cours de laquelle s'opposent les réponses à l'auto et à la xénopollinisation. En effet, contrairement à l'installation d'un métabolisme de type pollinique induit par la xénopollinisation, nous observons en auto-pollinisation un retour vers un métabolisme de type stylaire probablement perturbé.

- <u>une phase 3</u> définie dans le cas de la xénopollinisation par un retour tardif vers un métabolisme de type stylaire perturbé. Quant à l'autopollinisation, tout se passe comme si il y avait à nouveau induction d'un métabolisme de type pollinique.

Il convient de souligner que les phases 1 et 3 sont retrouvées dans la distribution des acides gras :

- soit pour la période 0-8 heures, évolution identique de la répartition des acides gras dans le cas de l'autopollinisation comme dans le cas de la xénopollinisation, avec seulement des différences d'amplitude ;

- soit pour 24 heures, divergence et opposition entre les répartitions induites par les deux types de pollinisation.

### CARACTERISATION DE LA COPULE OSIDIQUE

L'analyse de la copule osidique a été entreprise chez les MGCer, DGCer, TGCer et TrGCer. Cependant, après avoir défini les modalités de l'extraction et de l'identification des constituants de la copule osidique, seuls les résultats concernant les mono et diglycosylcéramides seront exposés ci-après.

#### I - EXTRACTION ET IDENTIFICATION DES CONSTITUANTS DE LA COPULE OSIDIQUE

L'analyse de la copule osidique (FOURNET, 1975) a été effectuée après hydrolyse des glycosphingolipides et extraction des acides gras par le n-hexane, sur une partie aliquote de la phase méthanolique. Les oses libérés, ainsi que le témoin interne de mésoinositol, sont méthanolysés en tubes scellés 24 heures à 80°C (fiche technique n° 14). Après dessication du méthanolysat sous courant d'azote à 50°C, le résidu est trifluoroacétylé à 150°C pendant 5 minutes puis chromatographié en phase gazeuse selon les conditions suivantes :

- appareil Varian aérograph, modèle 2100 muni d'un détecteur à ionisation de flamme ;

- colonne de verre remplie d'OV 210 à 5 % sur Varapot 30 ;

programmation de température entre 110°C et 210°C à raison de 1°C/minute ;
débit du gaz vecteur (azote) 7,5 ml/minute.

#### II - RESULTATS DE L'ANALYSE

L'analyse de la copule osidique des glycosphingolipides neutres s'est révélée intéressante et nous ne pouvons que vivement regretter l'obligation d'envisager cette composition à un niveau strictement analytique et de plus, en la réduisant à l'étude des MGCer et DGCer. Le protocole hydrolytique retenu, les nombreuses étapes de purification qui ont à ce jour fortement réduit nos extraits, ainsi que la faible représentativité de certains oses

# TABLEAU 41

# ANALYSE DE LA COPULE OSIDIQUE DES DIGLYCOSYLCERAMIDES

ose analysé croisement analysé	Rhamiose	Arabinose	Glucose	Mannose	Total
Styles vierges W166K	1,93	1,47	91,63	4,96	99,98
W166K.W166K 8 heures	3,04	1,41	93,97	1,56	99,98
W166K.T2U 8 heures	1,75	0,84	95,58	1,82	99,59
W166K.W166K 24 heures	13,04	11,19	72,89	2,87	95,99
W166K.T2U 24 heures	9,56	7,70	80,49	2,23	99,98
T2U.T2U 24 heures	1,73	3,01	91,90	3,35	99,99
T2U.W166K 24 heures	2,68	3,17	80,13	14,00	99,98
Pollen W166K	46,00	37,85	13,77	2,37	99,99
Pollen T2U	33,78	33,36	25,23	2,62	99 <b>,</b> 99

BUS

## COPULE OSIDIQUE DES DIGLYCOSYLCERAMIDES



Blis

dans les copules en sont responsables et ont rendu nos extraits indécelables par le type d'appareil que nous possédons. Les résultats de l'analyse sont consignés dans le tableau 41.

### 1 - Copule osidique des monoglycosylcéramides :

Sa composition après chromatographie en phase gazeuse apparaît comme très homogène, seul le glucose est identifié.

L'uniformité de cette composition se retrouve dans la distribution étudiée en fonction de la nature pollinique ou stylaire des extraits.

Les MGCer représentent environ 30 à 40 % des glycosphingolipides neutres totaux séparés. Ils sont composés essentiellement de glucose dans les pollens, les styles vierges, auto et xénopollinisés, indépendamment du génotype pollinique utilisé lors de la pollinisation compatible et incompatible.

### 2 - Copule osidique des diglycosylcéramides :

Sa composition est intéressante car très hétérogène ainsi qu'en témoigne le tableau 41 . Quatre oses sont identifiés : glucose, mannose, rhamnose et arabinose. Notons que la recherche d'osamines a été négative.

La distribution de ces oses dans les différents extraits polliniques et stylaires est analysée par la comparaison des chromatogrammes des extraits de pollens et de styles vierges W166K d'une part, et de celle des styles vierges et des styles pollinisés d'autre part.

a) <u>distribution au niveau des pollens et des styles vierges</u>. La comparaison des chromatogrammes des extraits de pollens et de styles vierges montre que ces extraits homogènes qualitativement par l'omniappartenance des 4 oses précités, sont nettement hétérogènes quantitativement. (figure 31).

Ainsi, les styles vierges W166K sont essentiellement caractérisés par de fortes teneurs en glucose (91,63 %) et par de faibles teneurs en mannose (4,96 %), en pentose (arabinose : 1,5 %) et en méthyl-pentose (rhamnose : 2 %). Les pollens renferment également glucose, mannose, arabinose et rhamnose mais ils diffèrent et s'éloignent nettement des styles vierges par les teneurs en ces oses.

Selon les génotypes des pollens analysés, nous constatons que le pollen W166K est plus riche en rhamnose (48 %), en arabinose (38 %) que le pollen T2U (38 et 33 % respectivement). Ces deux pollens sont également pauvres en hexoses puisque l'analyse décèle 13,7 % de glucose et 2,37 % de mannose pour le pollen W166K et 25,2 % de glucose et 2,62 % de mannose pour le pollen T2U.

Quantitativement, cette hétérogénéité s'est avérée intéressante dans la comparaison des pollens et des styles vierges puisque sur la base respective de leurs compositions osidiques, il devient possible de définir pollens et styles : les premiers, par leur richesse en diglycosylcéramides à pentose et méthylpentose (arabinose, rhamnose), les seconds définis par leurs diglycosylcéramides à hexoses (glucose, mannose).

Il nous a paru intéressant de considérer le devenir de cette hétérogénéité au cours de la pollinisation compatible et incompatible en comparant en particulier, la variation de cette composition osidique en fonction des styles auto et xénopollinisés après 8 et 24 heures de croisement.

b) <u>distribution en fonction du mode et de la durée de la pollinisation</u>. Dans le tableau 42 , nous avons représenté les variations nées de la pollinisation en tenant compte des résultats de l'analyse des bases à longue chaîne qui présentent, avec les résultats de cette étude de la copule osidique chez les pollens et les styles vierges, un parallélisme frappant : la distribution des oses est très différente en effet selon la nature des extraits, et permet d'envisager une distribution osidique à caractère pollinique et une distribution osidique à caractère stylaire.

Dans ce tableau, le sens des variations observées au cours de l'autopollinisation et de la xénopollinisation sont fléchées : la première flèche représentant la période de 0 à 8 heures, la seconde celle de 8 à 24 heures,

TABLEAU 42

104

Pallinitation	Туре р	ollen	Type stylaire					
Forchisticons	Rhamnose	Arabinose	Glucose	Mannose				
Autopollinisation	/ /							
Xénopollinisation								

La première flèche indique le sens des variations pour la période 0-8 heures ; la seconde flèche les représente pour la période 8-24 heures.

La xénopollinisation est donc caractérisée, de 0 à 8 heures, par l'augmentation de la teneur en glucose qui s'effectue au détriment des teneurs des autres oses et en particulier de celle du mannose. Puis de 8 à 24 heures, ces profils vont s'inverser et les teneurs en rhamnose, arabinose et mannose vont augmenter parallèlement à la diminution des valeurs du glucose qui perd environ 12 % de sa valeur initiale.

L'autopollinisation, de son côté, est caractérisée par non seulement l'augmentation de la teneur en glucose de 0 à 8 heures, mais aussi par celle du rhamnose. Par la suite de 8 à 24 heures, l'inversion des profils de distribution est essentiellement marquée par la diminution des teneurs en glucose (20 %) et par l'accroissement concomitant des taux en rhamnose, arabinose et mannose.

Les perturbations métaboliques qui accompagnent la pollinisation sont ainsi décelées dans le métabolisme osidique des diglycosylcéramides des styles ; l'autopollinisation ne diffère de la xénopollinisation que par l'amplitude de ces perturbations.

### 3 - Copule osidique des tri et tétraglycosylcéramides :

L'étude de la composition de la copule osidique de ces glycosphingolipides neutres a également été entreprise ; glucose, rhamnose et arabinose sont identifiés. Mais à ce stade de notre expérimentation, les extraits lipidiques disponibles s'étaient amenuisés et l'obtention de résultats quantitativement exploitables reposait non plus sur l'utilisation des colonnes de type "standard" munies de détecteur à ionisation de flamme mais sur celle de colonnes capillaires à détecteur à capture d'électrons.

#### III - CONCLUSION

Les diverses techniques d'hydrolyse et de trifluoro-acétylation du méthanolysat et de chromatographie en phase gazeuse permettent l'étude des glycosphingolipides neutres des extraits de pollens et de styles.

Les résultats de l'analyse des constituants de la copule glucidique des mono et diglycosylcéramides sont intéressants à considérer. MGCer et DGCer sont nettement séparés.

## 1 - Monoglycosylcéramides :

Analytiquement, les MGCer sont remarquables par l'homogénéité de la constitution de leur copule ; un seul ose, le glucose, est identifié dans tous les chromatogrammes. Ainsi la pollinisation n'intervient pas dans cette composition. Or, il n'est pas inutile de rappeler que l'autopollinisation est suivie d'une diminution de la teneur en ces glycosphingolipides neutres au niveau des styles pollinisés par rapport aux styles vierges et que ces valeurs demeurent également inférieures à celles relevées après xénopollinisation.

L'interprétation de ce fait est délicate. Il est possible de suggérer que ces teneurs faibles en autopollinisation peuvent être liées soit à la diminution ou à l'inhibition des processus de synthèse, soit au contraire, à l'intervention d'un catabolisme actif, lui-même dirigé par l'activité membranaire ou par le besoin énergétique du processus incompatible.

### 2 - Les diglycosylcéramides :

L'analyse de la copule osidique de ces glycosphingolipides neutres met en évidence une nette hétérogénéité de leur composition dans les extraits de pollens et de styles.

Quatre oses sont identifiés par chromatographie en phase gazeuse : glucose, mannose, rhamnose et arabinose. Par cette composition, les glycosphingolipides de *Petunia* sont proches de ceux de *Gladiolus* (CLARKE, HARRISON et KNOX, 1978) où arabinose, rhamnose et glucose ont été détectés, mais qui en diffèrent par leurs teneurs en mannose.

La cinétique de la distribution du glucose dans ces lipides est quantitativement marquée par l'augmentation de sa vitesse et de son taux d'incorporation. Décelable après 8 heures de croisement, compatible et incompatible, elle semble s'effectuer au détriment du mannose principalement. Après 24 heures, une inversion des valeurs s'est opérée et du glucose en proportions non négligeables est libéré.

Un second point doit être souligné : l'influence de la composition pollinique qui peut être évoquée en considérant l'évolution des teneurs en rhamnose en fonction des deux pollinisations [W166K.W166K] et [T2U.T2U]. Dans le premier exemple, l'autopollinisation W166K.W166K est suivie par l'augmentation significative et constante en cet ose. Dans le second exemple, cette évolution ne se retrouve pas. Compte tenu des profondes différences de composition entre pollens et styles, il semble que l'inégalerichesse en rhamnose des deux pollens (W166K : 46 % ; T2U : 39 %) soit responsable du sens des variations de la copule osidique de 0 à 8 heures.

Enfin, il convient de souligner la présence significative du mannose. On sait depuis longtemps qu'il peut conférer aux molécules de glycolipides dans lesquelles il est intégré, certaines propriétés de reconnaissance. Cet ose est d'autant plus intéressant qu'il est reconnu comme constituant de la copule glucidique des glycoprotéines. Il est également proposé comme précurseur des oligosaccharides plus longs. Lors des premières phases de la pollinisation (O à 8 heures) la forte et rapide incorporation du glucose s'effectue au détriment du mannose. Il serait très séduisant de supposer que, par son évolution dans le processus de pollinisation réduit à 3 stades (reconnaissance du génotype pollinique, transfert de cette information et réponse), le mannose représente une des molécules responsables sur le site de reconnaissance, de l'identification ou du moins est la première molécule touchée par le signal de reconnaissance de ce génotype ou de la présence pollinique.

:1

# DISCUSSION ET CONCLUSION

-	Aspects analytiques	108
	I - Biochimie des pollens et des styles	109
	II - Biochimie de la pollinisation	109
-	Physiologie de l'incompatibilité et activités membranaires	112
	<ul> <li>I - Variation de la composition en oses et relations avec l'induction de la synthèse des bouchons de callose</li> </ul>	113
	II - Variation de la composition en oses et surfaces cellulaires	116
	III - Variation de la répartition des acides gras et propriétés membranaires	117
	IV - Hypothèse du signal	119
	1 – Réponses électrophysiologiques à la pollinisation	121
	2 – Interprétation	121

			Č.	
	0	5		199
-	conclusion	generale		166

\_00\_00\_00\_00\_

### DISCUSSION

#### CONCLUSION

Nos essais d'isolement, de fractionnement et de caractérisation des glycosphingolipides neutres des extraits de pollens et de styles chez *Petunia hybrida* nous conduisent à des résultats positifs sur le plan analytique. Sur le plan physiologique, bien que la plus grande prudence s'impose quant à l'interprétation de ces résultats en fonction de l'incompatibilité gamétophytique de fécondation, il est cependant évident que les variations quantitatives et qualitatives relevées dans les structures de ces lipides semblent constituer vraisemblablement une première approche du processus de reconnaissance du gène S d'incompatibilité, par la production d'un signal, et de la transmission du signal (ou de son information) dans les styles. Il est tout aussi vraisemblable que ces variations correspondent à une expression moléculaire des structures membranaires dont les propriétés physicochimiques et électrophysiologiques varient en fonction de la pollinisation.

### ASPECTS ANALYTIQUES

Nous avons abordé successivement dans ce travail, l'analyse des glycosphingolipides totaux, neutres totaux et celles de leurs différentes classes (Cer, MGCer, DGCer, TGCer et TrGCer) ; par la suite, l'étude des acides gras en fonction de la longueur de leur chaîne, de leur degré de saturation,

ET

# TABLEAU 43

# RECAPITULATIF

[	[	Cer HGCen				Vaci	24			TGCer -					ThGCer											
		P	S	8 h + x	24 h + x	P	S	\$ h + )	x  +	24 h X	Р	S	\$	h x	24 h +	x	P	S	8 h + x	2+	4 h x	Р	S.	8 h • x	+	14
	C12 : 0	1				+ +		11	4	$\langle X \rangle$	+ +		1	1	$f^{\Lambda}$	1 +	- ++		11	/	1 4					
	C13 : 0	1	+ +	14	14							•									man					
	C14 : 0						4 4	1	A	14		+ +	-	K X	1	1		++	÷ /		./					
	C14 : 1									•								+ +	71		4					
	C15 : 0		+++	4	14/		++	X	4	13								+ 1	4		$\langle /  $		+ +	<u>\</u>	12	1
	C16 : 0		+ +	141	$ \rangle$		++	1	X	17		+ +	+	51	1		:+		11	-44			++	X	4	-
5	C16 : 1		+ +	1	14		++	1	N.	11	++		1	\$ 1	1	1		++	13	1	4					
CC	C18 : 0		+ +		117						1					1,010	+ +		191		14				_	
CIDES	C13 : 2										++		1/	1	1	1					91 a.			4	-	1
-	C20 : 0																					+ +		7	4	1
	C20 : 1	4. 4		<i>f</i> =	X/										 					-					-	~~~
	C22 : 0	+ -	F	11	N/	++		1		/	1											+ +		1	1	1
	C23 : 1	+ -	-	11			1					<u> </u>	_							_					4	7
	024 : 0											1								_				1	1	1
	d16 : 0 117 : 0	+ -	4-		171	1							-							-		++		1		24
	$\frac{217 : 0}{13 : 0}$	+ •	+	71	$\mathbb{N}$	+++	+	1	1	11	4++	-	_	<u>}/</u>	X	_	1 +		1		≅ /	+++		1	4	
	d16 : 1		+ -	+ 17	$\Delta$	+++	+	12	1	1;	4	+	-	1/	1	1		+ +	1/3	N I	$\underline{\vee}$				7	1
ES	$d_{10} : 0$ $t_{12} : 0$				1							+	-+	17		X				_	. \		++	X	2	
CHAIN	d17 : 1 t13 : 1	4-	+	11	$ \rangle\rangle$							-+-	4-	24	12	3		+ +		2	71					
Saues	d'8 : 1						+ +	-	1	11	1_	+	+	11	44	in the second	+ +	•	1		17		++	1	A	
TOW	d19 : 0 t20 : 0	+	+	11	12	1					+	+		71	1	/	++	+	12		X		++	1	1	1
SES /	d20 : 0	_		-				_										++	- 2	1	14		++	1	21	
5	J																					++				1
	К									ļ								_ <b>_</b>				+ +				1
	L							_						-75	1	4						++			=	1
	Enemnose		_								+	+			17	4 /										-
S	Arabinose			_							+	+		13	1/	-/										-
CS1	Glucose					+	++	+				-+	+	11	4	A	4-									-
	Mannose											1	+ +	12	17	A /										

BUS

des bases à longue chaîne et celle des copules osidiques a été envisagée afin de mieux comprendre leur éventuelle participation à la structure et à l'activité membranaire au cours de la pollinisation compatible et incompatible.

### I - BIOCHIMIE DES POLLENS ET DES STYLES

Cette étude s'est révélée intéressante par plusieurs aspects. Tout d'abord, elle nous a permis de contribuer à l'enrichissement de nos connaissances sur la biochimie des pollens en fonction de leurs génotypes respectifs. D'une manière générale, les pollens s'individualisent nettement des styles par leurs acides gras à chaîne longue C20 : 1, C22 : 0, C23 : 1 (Cer), C20 : 0, C22 : 0, C24 : 0 (TrGCer) ou courte des MGCer, DGCer et TGCer (C12 : 0) et par la nature des bases à longue chaîne.

L'analyse montre donc que les glycosphingolipides des pollens et des styles diffèrent nettement par leur composition en acides gras et en bases à longue chaîne et (bien qu'incomplète) dans la fraction osidique (tableau récapitulatif n° 43).

Cette étude s'est révélée intéressante également par la définition des principaux groupes de glycosphingolipides extraits non seulement des pollens mais aussi des styles vierges, autopollinisés et xénopollinisés.

#### II - BIOCHIMIE DE LA POLLINISATION

Les variations quantitatives et qualitatives observées sont en relation avec la pollinisation qui montre dans un premier temps (0-8 heures) une croissance des tubes polliniques, quel que soit le type de réponse, puis (8-24 heures) une divergence nette entre la réponse compatible et incompatible.

Il semble qu'un ensemble de faits soit nettement en corrélation d'une avec la croissance des tubes polliniques en fonction d'une information reçue par les styles. Le sens des variations observées est schématisé dans le tableau 44.

# TABLEAU 44

# VARIATIONS QUANTITATIVES DES GLYCOSPHINGOLIPIDES

	autopo	llinisation	xénopol	linisation	comparaison +/x			
	0h	8h 24h	0h	8h 24h	8h	24h		
GSL totaux		1		/*	=	E		
GSL acides totaux		in	a de	/		#		
GSL neutres		/	/		≠	≠		
Cer		1	~		=	=		
MGCer		/	1					
DGCer	/*		/		=			
TGCer	1		/	N	att i 16. ma Stroke i 18 Senatur	Print Home Million Jan H Swagaya		
TrGCer	1		/	1	S Without Billionau Billionau Billionau	7		

## TABLEAU 45

## ETUDE COMPARATIVE ENTRE AUTO ET XENOPOLLINISATION

	W1 8 h	66K 24 h	T2U 24 h		Caractères de l'autopollinisa- tion
GSL totaux	+ < x	+ < x	+ <	х	8h catabolisme 24h catabolisme
GSL acides	+ > X	+ < X	+	Х	8h 24h catabolisme
GSL neutres	+ < x	+ < x	+ <	Х	8h catabolisme 24h catabolisme
Cer	+ < X	+ > x	+ >>	Х	8h catabolisme 24h
MGCer	+ ≪ x	+ < x	+ <	Х	8h catabolisme 24h catabolisme
DGCer	+ < x	+ < x	+ >	X	8h catabolisme 24h catabolisme
TGCer	+ > X	+ < x	+ <	Х	8h 24h catabolisme
TrGCer	+ > X	+ > X	+ >	Х	8h 24h

Généralement, auto et xénopollinisation présentent de grandes analogies dans les premières heures de la pollinisation (0-8 heures), elles ne diffèrent que par leurs teneurs en glycosphingolipides acides et en TrGCer après 24 heures. Dans le tableau 45, nous avons voulu illustrer schématiquement les aspects quantitatifs de la pollinisation. Auto et xénopollinisation diffèrent l'une de l'autre, essentiellement par l'amplitude des variations de nature métabolique. Logiquement, ces différences relèvent d'interrelations métaboliques. Par exemple, il est possible que la synthèse des di, tri et tétraglycosylcéramides s'effectue à partir des céramides et des monoglycosylcéramides ; cependant, il s'est avéré très difficile de définir une orientation générale.

Il est tentant de rapprocher cette répartition des glycosphingolipides après pollinisation compatible et incompatible de celle des glycolipides (au sens large du terme) et des glycoprotéines des cellules normales ou non en croissance. VICKER et CRITCHLEY (1977) ont montré que la croissance tissulaire était accompagnée d'une diminution des teneurs en glycolipides et d'un raccourcissement de leurs chaînes polysaccharidiques. Parallèlement à ces faits, les teneurs en glycoprotéines allaient croissantes ainsi que la longueur de leurs chaînes osidiques.

Ainsi, les cellules en croissance sont caractérisées par la diminution de leurs teneurs en glycosphingolipides dans un premier temps et par celle de la longueur de leur chaîne polysaccharidique. Les styles autopollinisés sont plus pauvres en Cer et MGCer et plus riches en TGCer et TrGCer que les styles xénopollinisés. Leur état de croissance étant inférieur à ceux des styles xénopollinisés, ceci souligne l'influence des facteurs de croissance favorisant nettement la xénopollinisation (en autopollinisation, la croissance des tubes incompatible est faible mais non nulle).

L'opposition constatée peut être comprise tout d'abord par l'influence de différents facteurs telle l'auxine, sur les activités enzymatiques qui seraient fortement stimulées dans le sens des synthèses pour les di, tri et tétraglycosylcéramides en incompatibilité. Par contre, l'évolution des céramides et monoglycosylcéramides évoque en incompatibilité, l'influence d'un catabolisme actif ou/et l'absence d'activation des processus de synthèse. Elle peut aussi être comprise dans une seconde hypothèse, par la transcription d'un signal entraînant le retard ou l'inhibition de ces mêmes systèmes. L'induction d'un métabolisme de type pollinique après xénopollinisation et dans les premiers stades de l'autopollinisation, est parfaitement illustrée par les résultats de l'analyse des bases à longue chaîne où ce métabolisme de type pollinique est plus net,que par les résultats de l'étude des acides gras.

Les vitesses d'induction de ce métabolisme diffèrent en fonction du type de pollinisation considéré. Le maintien de ce métabolisme, ou son retour vers un métabolisme de type stylaire, est également fonction du type de pollinisation. Tout concourt à démontrer que l'autopollinisation, incompatible avec la croissance du tube pollinique dans les tissus stylaires, est adaptée dans ses structures membranaires à ne pas maintenir à longue échéance un métabolisme qui normalement assurerait la croissance du tube pollinique.

On sait que chez *Petunia hybrida*, la réaction d'incompatibilité se situe à mi-chemin entre le stigmate et l'ovaire. Ce qui implique que le tube pollinique incompatible possède un potentiel, faible mais réel, de croissance et de synthèse.

L'induction, quelle que soit la pollinisation, d'un métabolisme de type pollinique qui ne s'oriente que tardivement vers un métabolisme à caractère stylaire ne peut se comprendre qu'en envisageant la réception puis la transcription d'un signal de reconnaissance qui serait "lent" et induirait peu à peu en incompatibilité, des perturbations dans le "complexe métabolique" régi par l'auxine stylaire. Ce complexe est également en relation avec les systèmes membranaires du style autopollinisé. Il est évident que ces structures membranaires participent par l'évolution de leurs structures aux nouvelles orientations des activités enzymatiques régies par l'auxine et à la lenteur de la transmission du signal qu'elles ont reçues.

Nous abordons ainsi un ensemble de faits qui sont au centre de la physiologie de l'incompatibilité et de celle des membranes que nous allons essayer d'exposer succintement, afin de mieux comprendre la répercussion des résultats de l'analyse des glycosphingolipides neutres qui appartiennent aux structures membranaires.

111

# PHYSIOLOGIE DE L'INCOMPATIBILITE ET ACTIVITES MEMBRANAIRES

Il est certain que la plus grande prudence s'impose dans l'interprétation des résultats de l'analyse de ces constituants membranaires dans les relations avec la physiologie présentée par l'autopollinisation, puisqu'ils ne constituent qu'une approche préliminaire.

Nous savons (LINSKENS, 1967 ; ROGGEN, 1967) que la physiologie de l'incompatibilité est marquée par l'exaltation des besoins énergétiques, par des modifications de la perméabilité membranaire à l'eau, aux ions, aux substrats, par des perturbations du métabolisme protéique, glucidique et lipidique qui conduisent les tissus stylaires à un état de différenciation très différent de celui des styles xénopollinisés.

En xénopollinisation, la biosynthèse et la croissance de la paroi du tube pollinique sont caractérisées par la dominance des dépôts de microfibrilles de cellulose (c'est-à-dire d'enchaînement d'unités glucose par des liaisons glycosidiques  $\beta$  1,4) par rapport aux autres constituants, dont la callose (formée d'enchaînement d'unités glucose par des liaisons glycosidiques  $\beta$  1,3).

En autopollinisation, par contre, il est très anciennement établi qu'elle est caractérisée par l'inhibition de la croissance du tube pollinique et par un dépôt de callose strictement localisé dans sa partie apicale. Cependant, un abondant dépôt de glucose et de callose est observé et contribue à épaissir les parois du tube inhibé dans son élongation.

La formation de ce dépôt de callose est donc remarquable sur le plan biologique (terme final de la réaction); elle l'est également sur le plan biochimique (terme final de la déviation du métabolisme glucidique et de l'orientation de la biosynthèse de la paroi du tube).

Ce dernier aspect est intéressant car on sait que la synthèse de la cellulose et celle de la callose résultent de l'activité des synthétases. Dans le cas de la callose, sa biosynthèse est due à une  $\beta$  1,3 glucane synthétase qui peut fonctionner comme glucose  $\beta$  1,3 glucane transférase à partir d'un nucléotide, l'UDP-glucose. Quant à la cellulose, sa biosynthèse résulte de l'activité d'une  $\beta$  1,4 glucane synthétase possédant également une activité de glucosyl transférase. Ces deux enzymes sont donc compétitives pour le même substrat et diversement activées par les ions tel le Mg<sup>2+</sup> par exemple qui, à des concentrations faibles stimulent la  $\beta$  1,4 synthétase et à cette même concentration réduit de moitié l'activité de la  $\beta$  1,3 synthétase. Leurs activités sont d'autre part stimulées par le glycérol, cependant que le glucose, le cellobiose et l'élévation du pH (7,2 - 8,5) augmentent la formation de  $\beta$  1,4 glucanes (TSAI et HASSID, 1971).

# I - VARIATION DE LA COMPOSITION EN OSES ET RELATIONS AVEC L'INDUCTION DE LA SYNTHESE DES BOUCHONS DE CALLOSE

Sans parler des réactions de reconnaissance où les chaînes polysaccharidiques jouent un rôle prépondérant, il semble, bien que nos résultats soient fragmentaires, que la structure des chaînes osidiques des glycosphingolipides est influencée par la pollinisation.

Au niveau des glycosphingolipides neutres, il semble que l'on assiste de 0 à 8 heures de croisement à l'activation des glycosyltransférases conduisant à une augmentation de l'incorporation du glucose dans ces lipides. Cette observation pourraît être rattachée à un processus de régulation des structures et des activités membranaires par les hormones du style-et notamment l'acide  $\beta$  indolyl acétique (AIA)-qui contrôlent les activités enzymatiques et en particulier celles qui oeuvrent à l'élaboration des constituants de la matrice des parois et notamment du tube pollinique.

Un raisonnement analogue pourraît être avancé pour expliquer les faits observés au cours du second stade de la pollinisation. On assiste, semble-t-il, de 8 à 24 heures, à la dégradation de ces mêmes molécules, processus qui entraînerait la libération d'unités glucosidiques. Dans cette hypothèse, la rupture des liaisons  $\beta$  1,4 dans le cas du glucose, résulte de l'activité de  $\beta$  1,4 glucanase (la dégradation de la callose des parois est dûe à l'activité de  $\beta$ 1,3 glucanases). Ces enzymes sont exogènes aux membranes et la plupart des auteurs s'accordent pour les localiser dans les parois où leurs activités sont responsables de la réduction du taux en glucanes. Les  $\beta$ 1,3 glucanases agissent essentiellement sur les glucanes neutres et les glucurono-arabino-xylanes. Elles sont activées par les hormones du style et notamment par l'AIA et vont ainsi modifier la matrice en libérant les constituants de la paroi et favoriser l'extensibilité.

L'autopollinisation est caractérisée histologiquement par un important dépôt de callose, dont la biosynthèse repose sur l'activité des glucanes-hydrolases préparant les matériaux, mais aussi de celle des glucannes synthétases-transférases qui assurent l'incorporation dans une nouvelle matrice par enchaînement  $\beta$ 1,3 caractéristique de ce polyoside. C'est donc par l'activation des  $\beta$ 1,3 glucanne-transférases que le métabolisme glucidique acquiert son caractère particulier en autopollinisation. Par contre, en xénopollinisation, le métabolisme glucidique conduisant à une croissance du tube pollinique reposera sur l'activation des  $\beta$ 1,4 glycosyl-transférases. Ces deux enzymes coexistent dans la membrane et leurs activités sont nettement stimulées par l'AIA.

Grâce aux grands progrès techniques, tels la préparation des membranes, l'utilisation du marquage isotopique, le contrôle de la pureté des membranes et de la localisation des constituants membranaires, il a été possible de définir la participation de deux systèmes : l'un vivant et actif, l'ensemble des membranes cellulaires ; l'autre bien moins inerte et passif que ne le laisserait supposer la rigidité de sa structure, la paroi.

Ainsi, BRETT et NORTHCOTE (1975) ont montré que les cligosaccharides liés aux protéines ou aux lipides, peuvent être considérés comme des intermédiaires de la biosynthèse des  $\beta$ -glucanes. Les fractions membranaires des Pois riches en dictyosomes, préparées sans fixateur chimique sont, après incubation avec des cellulases, homogénéisation et fractionnement en gradient de densité, contrôlées en microscopie électronique. Ces fractions membranaires incorporent activement l'UDP-glucose dans des glycolipides insolubles dans l'eau ; des oligosaccharides liés à une protéine sont également synthétisés.

BRETT et NORTHCOTE ont constaté que la synthèse des β-glucannes est catalysée par des enzymes liées aux membranes qui utilisent l'UDP-glucose

114

#### FIGURE 32

# REPRESENTATION SCHEMATIQUE DES DEUX SITES D'ACTION POSSIBLE DE L'AUXINE AU NIVEAU DE LA PAROI CELLULAIRE



<u>Le site B</u> correspond à l'action directe de l'auxine au niveau de la paroi (l'auxine agirait en synergie avec les enzymes) ou au niveau de la membrane (l'auxine affecterait les propriétés de perméabilité).

Le site A correspond à l'action indirecte de l'auxine sur le métabolisme cytoplasmique (résulte indirectement des changements intervenus au niveau de la paroi cellulaire).

BUS

et le GDP-glucose comme substrats. Le premier nucléotide est incorporé dans les  $\beta$ 1,3 glucannes et les  $\beta$ 1,4 glucannes ; le second, uniquement dans les  $\beta$ 1,4 glucannes. Le contrôle de la distribution de la radioactivité montre que 10 % de cette radioactivité se retrouvent dans les membranes, un seul ose est radioactif : le glucose.

Dans les fractions lipidiques, la radioactivité observée dans les glycolipides appartient essentiellement aux stéroyl-glycosides et aux polyisoprenoide-phosphate-glycosides. Les oses seraient liés aux lipides par des liaisons phosphates. Dans les fractions oligosaccharidiques, la radioactivité relevée dans des polyglucannes (enchaînements $\beta$ 1,3 et  $\beta$ 1,4) ne donnent après hydrolyse que du laminaribiose ( $\beta$ 1,3).

L'activité glucosyl-synthétase n'est pas associée à une seule fraction membranaire mais aux dictyosomes, mitochondries, et au réticulum endoplasmique (vésicules lisses), ce qui laisse penser que les activités identifiées strictement dans les vésicules golgiennes correspondent à une autre enzyme. Dans le cas de la callose, sa synthèse semble localisée à la surface cellulaire.

De plus, le modèle proposé par BANDURSKI et PISKORNIK permet de localiser en deux sites, l'un pariétal, l'autre membranaire, la synthèse des constituants de la paroi. Cette synthèse est contrôlée par l'AIA (figure 32 Dans le site pariétal, les facteurs endogènes de croissance (UDP-glucose et acide ascorbique-oxydase) sont localisés sur les parois. Pour le site membranaire, les facteurs endogènes sont situés dans le plasmalemme et dans les organelles qui lui sont associées (plasmalemmosomes, corps multivésiculaires et vésicules golgiennes). Il est généralement admis que le plasmalemme serait directement responsable de la synthèse des microfibrilles de cellulose. Les plasmalemmosomes sont hétérogènes et souvent accompagnées d'invaginations non structurées (fossettes) à rôle sécréteur (PILET, 1971). Les plasmalemmosomes formées à partir soit du réticulum endoplasmique à un seul feuillet, soit du feuillet externe de la membrane nucléaire, soit des deux feuillets nucléaires, peuvent être considérées comme des organelles directement engagées dans 1/670 laboration des parois squelettiques. Leurs enzymes assureraient la polymérisar tion des constituants de la future paroi et peut être même la sécrétion de ses précurseurs.

115

Cet exposé peut paraître assez long, mais il nous a paru important de rappeler ces multiples acquisitions car leur intérêt réside finalement dans les relations AIA - membranes vivantes, et dans le circuit de régulation qui apparaît dans ces structures. Nous ne pouvons que les résumer ici.

L'AIA modifie la pression osmotique et augmente les entrées en eau et par là la turgescence cellulaire. Elle va donc contrôler et régler l'état de perméabilité de la membrane ainsi que les activités enzymatiques qui participent à la biosynthèse, au transport, à la polymérisation et à l'incorporation des constituants de la paroi. Son action sera directe sur la structure et l'activité membranaire par le contrôle qu'elle exerce sur les activités des enzymes endogènes ; le contrôle sera indirect par le biais des enzymes exogènes qu'elle contrôle. L'AIA est à son tour soumise à régulation suivant le taux de protons libérés dans le milieu. L'origine des protons peut être recherchée dans l'activité accrue de l'acide ascorbique - oxydase qui agit sur la forme enediol de l'acide ascorbique la transformant en acide déhydroascorbique avec libération d'hydrogène, ce qui a pour effet à partir des liaisons disulfures d'une glycoprotéine localisée dans la paroi, d'augmenter la formation de groupements-SH.

D'autre part, LAMPORT (1965) a proposé un schéma tenant compte de l'action de l'auxine sur la respiration ce qui entraîne une modification du taux de ces mêmes groupements-SH. En effet, la consommation accrue d'oxygène entraîne la transformation de l'ATP en ADP et la libération d'une liaison phosphate énergétique. La fixation de cette liaison sur du glucose entraîne l'augmentation des concentrations en glucose-6-P, ce qui a pour conséquence l'induction de la glucose-6-phosphodéshydrogénase. L'action de cette enzyme est couplée à celle du NADP<sup>+</sup>qui se transforme en NADPH + H<sup>+</sup>, ce qui entraîne successivement l'élévation du taux en protons et la formation de groupements-SH à partir des groupements disulfures de la glycoprotéine.

### II - VARIATION DE LA COMPOSITION EN OSES ET SURFACES CELLULAIRES

Il nous paraît intéressant de faire un parallèle entre les particularités présentées par l'induction d'un métabolisme à caractère pollinique

116

et les incorporations des chaînes polyosidiques dans les surfaces cellulaires. La compatibilité est caractérisée par l'induction d'un métabolisme à caractère pollinique : elle correspond à l'incorporation de pentoses dans la chaîne osidique des glycosphingolipides.

Certaines enzymes, et en particulier celles qui régulent l'allongement séquentiel des oses à l'extrémité réductrice des chaînes polysaccharidiques, sont des composants des surfaces cellulaires (FRIEDMAN, 1977). Selon les travaux de SLOMIANY et coll. (1977), les complexes enzymatiques contrôlant l'arrangement des unités osidiques dans les glycolipides et glycoprotéines, seraient identiques. Il est tentant de penser qu'entre deux types de structures cellulaires, et en particulier entre les deux structures de typespollinique et stylaire, des modifications mutuelles apparaîssent par transglycosylation. Ceci serait intéressent à étudier ainsi que la structure des glycopphingolipides à longue chaîne polysaccharidique qui, solubles dans la phase acqueuse, n'ont pas été analysés.

#### III - VARIATION DE LA REPARTITION DES ACIDES GRAS ET PROPRIETES MEMBRANAIRES

Les céramides, points de départ ou d'aboutissement des chaînes métaboliques, représentent environ 1/3 des glycosphingolipides totaux. Toutes les variations enregistrées à leur niveau auront plus tardivement, des répercussions sur la structure des autres glycosphingolipides.

L'étude de la composition en acides gras des céramides après auto et xénopollinisation, permet de mettre en évidence la mobilisation de certains types d'acides gras (tableau 46).

	-	L	X				
an and sports from the state of	acides gras courts	acides gras Longs	acides gras courts	acides gras longs			
8 heures 24 heures	1 1	A	-				

Tableau 46.

Il est difficle avec les éléments dont nous disposons, de mieux définir le rôle des acides gras dans la physiologie des cellules végétales. Cependant, des travaux récents ont conduit à proposer et à démontrer l'hypothèse du rôle déterminant de la composition en acides gras dans le contrôle de la physiologie membranaire (FRIEDMAN, 1977). En particulier, une relation existe entre l'altération de la composition en acides gras et le changement de la perméabilité aux ions et des activités enzymatiques des membranes (HASLAM et coll., 1973 ; DAVIS et coll., 1974 ; WOJTCZAK, 1974).

Les mécanismes de transport passif ou actif liés à la présence d'enzymes sont influencés par le contenu en acides gras des membranes. Par exemple, la perméabilité des ions potassium dans les liposomes augmente parallèlement à l'accroissement de degré de désaturation des acides gras (VAN DEENEN, 1972 ; DAVIS et SILBERT, 1974). Le transport actif des ions au niveau des mitochondries et du réticulum sarcoplasmique est également en relation avec la présence d'acides gras désaturés (HASLAM, 1973).

Ces altérations des phénomènes membranaires induites par les variations de la composition en acides gras, sont attribuées à diverses altérations : de l'architecture membranaire résultant des perturbations des relations entre composés protéiques et lipidiques de la membrane ou de l'état physique de la membrane cellulaire (fluidité des lipides). Or, si les perturbations de la compositions en acides gras altèrent les propriétés de perméabilité aux ions, ou l'activité d'enzymes responsables du maintien des gradients ioniques à travers la membrane, il en résulte des différences de propriétés électriques de ces membranes ainsi modifiées. Cela se traduit en particulier par des modifications de la résistance ou du potentiel d'action membranaire. Ces changements sont observés quand on augmente le pourcentage d'acides gras saturés dans une membrane, car on accélère également la transition de phase du cristal "solide-liquide".

Ces changements des propriétés physiques des membranes cellulaires, sont détectables in vivo par des techniques électrophysiologiques (FRIEDMAN, 1977). LINSKENS et coll. (1973) ont également appliqué ces mêmes techniques chez *Petunia hybrida*. Des variations d'amplitude du potentiel d'action sont décelées entre le stigmate et la base de l'ovaire, en relation avec la pollinisation compatible et incompatible. Les acides gras des glycosphingolipides neutres analysés (et la nature plus ou moins saturée des bases à longue chaîne) déterminent une structure physique de la membrane. Les variations de leur composition telles que nous les avons observées doivent se répercuter sur cette structure membranaire et par là, sur certaines de leurs propriétés physiologiques telle que la perméabilité. Il semble également possible de relier ces changements avec l'hypothèse de la production d'un signal issu de la reconnaissance et transmettant l'information.

#### IV - HYPOTHESE DU SIGNAL

Son existence a été postulée sur la base des altérations protéiques après pollinisation (LINSKENS, 1973 ; DEURENBERG, 1976a, 1976b, 1977a). Son émission s'effectue à partir du stigmate vers le style et l'ovaire ce qui explique que les différents processus métaboliques aboutissent à une différenciation protéique très diversifiée.

Deux mécanismes sont actuellement proposés qui reposent sur la participation de substances de diffusion et/ou sur celle d'un signal électrique.

Des substances de diffusion sont connues dans le règne végétal, en relation avec les mouvements rhéomonastiques et les réactions phototrophiques. Dans l'hypothèse de substances de diffusion, on connaît l'existence dans le style de *Petunia hybrida* de deux petits faisceaux vascularisés et différenciés dans le xylème et le phloème qui pourraient, comme le tissu conducteur, assurer la conduction de ces substances. Le marquage par la leucine tritiée du pollen conduit à des résultats qui vont, sinon à l'encontre de ces substances de diffusion, du moins à la reconnaissance de signaux électriques "lents" (DEURENBERG, 1977).

Ainsi, il semble bien que la première manifestation que l'on puisse identifier dans la chaîne des réactions de reconnaissance soit une manifestation électrophysiologique. Il est nécessaire à ce stade d'envisager quel est le rôle des membranes dans la réception et la transmission du signal électrique ; quelle est également l'influence de la perméabilité et de ses modifications en relation avec les variations de la structure lipidique de la membrane en fonction de l'incompatibilité.

Depuis l'époque où DUBOIS-RAYMOND (1849) avait montré que la capacité d'excitabilité et surtout de propagation de l'influx nerveux s'accompagne d'un signal électrique, les propriétés des membranes (irritabilité et conduction) sont exclusivement envisagées en termes électriques.

Les premiers travaux sont basés sur l'étude de la conduction par la membrane cytoplasmique de l'axone géant du Calmar, d'un signal d'excitabilité. Le milieu habituel dans lequel baigne l'axone est le sang du Calmar dont la composition ionique est très proche de celle de l'eau de mer. La composition ionique du compartiment interne de l'axoplasme s'en éloigne considérablement par sa forte concentration en ions K<sup>+</sup>, anions organiques et  $P0_{l_4}^{3^-}$  et par sa très faible concentration en ions Na<sup>+</sup> et en ions divalents Ca<sup>2+</sup> et Mg<sup>2+</sup>.

Ceci conduit à admettre que la surface de la membrane de la fibre nerveuse serait dissymétrique puisque constituée de deux couches très différentes par leurs propriétés électriques :

- l'une correspondrait à la couche externe dont les nombreux sites anioniques liés aux macromolécules de la membrane seraient saturés par des ions bivalents ;
- l'autre couche, interne, à sites anioniques seraient saturés par des ions positifs.

Une telle conception de la membrane implique que le nombre de charges positives (et par conséquent le nombre de site anioniques) de la surface externe soit plus grand que le nombre de sites anioniques de la couche interne, d'où l'assymétrie de la surface. Cette "dissymétrie" dans la répartition des ions est liée au transport actif des ions monovalents et à la grande résistance électrique de la membrane. Elle va se traduire par un potentiel interne négatif par rapport au milieu extérieur. La différence de potentiel de la membrane au repos est d'environ -40 à -60 mV. Au cours de l'excitation cathodique, le passage de l'influx nerveux se traduit par une variation du potentiel interne dit "potentiel d'action", qui s'inverse en quelques millisecondes, devient positif puis redescend lentement au potentiel initial. Cette variation du potentiel d'action qui passe de -50 mV à + 100 mV correspond à la dépolarisation de la face supérieure qui devient négative par rapport à l'axoplasme.

### 1 - Réponses électrophysiologiques à la pollinisation :

LINSKENS et SPANGERS (1973) chez *Petunia hybrida* enregistrent après pollinisation une faible augmentation des potentiels d'actions qui se deviennent négatifs ultérieurement. D'origine ionogénique, le signal varie également avec l'âge; à la maturité les styles donnent des réponses plus nettes que les jeunes styles. De plus, l'intensité et la vitesse de positivation diffèrent selon qu'il s'agit d'auto ou de xénopollinisation. Le maximum de positivation (50-80 mV) est plus élevé et plus tardif (30 à 80 mn) en xénopollinisation ; la négativation (-20,-30 mV) est atteinte après 3 heures.

La positivation est moins élevée (15-25 mV), plus rapide (7 à 25 mn) après autopollinisation, les valeurs négatives du potentiel d'action sont atteintes en 2 heures plus rapidement et de façon plus intense (-60 mV) qu'en xénopollinisation.

Ces différents travaux sont d'autant plus intéressant à considérer qu'ils soulignent l'identité de comportement électrophysiologique dans des membranes excitées et chez les styles de *Petunia hybrida* après pollinisation ; les valeurs négatives au départ, s'inversent, deviennent positives puis régressent.

#### 2 - Interprétations :

Jusqu'à ces dernières années, une explication à ces changements transitoires a été recherchée dans la conformation des protéines membranaires sous l'influence du déplacement des ions divalents attirés par le courant électrique d'excitation. Leur départ libère un certain nombre de sites anioniques qui vont très rapidement être saturés par des ions monovalents, d'où le changement de conformation de la membrane. Ceci entraîne la formation d'un passage favorisant la diffusion des ions. La perméabilité serait donc transitoirement accrue, entraînant un flux local dans cette zone. Le changement de perméabilité aux ions doit surtout être recherché dans la production d'un circuit électrique local. Ceci a été observé par exemple avec les ions K<sup>+</sup> et Na<sup>+</sup>. CHANGEUX et ses collaborateurs (1968) ont proposé une théorie de l'excitabilité des membranes plasmiques applicable aux cellules nerveuses en particulier. La membrane est composée de sous-unités lipoprotéique (protomères) associées en réseau-plan ; les changements conformationnels induits par excitabilité, modifient la coopérativité initiale de ces sous-unités structurales. Il suffit d'ailleurs, dans ce système, du changement conformationnel d'une seule molécule (sous l'influence d'un ligand) pour provoquer, par la contrainte qu'il exerce sur les autres molécules, des changements de conformation qui gagnent ainsi de proche en proche l'ensemble des protomères. Une telle membrane est comparable à un amplificateur biologique grâce à cette coopérativité issue de la contrainte moléculaire dans l'architecture membranaire.

Il est également tentant d'invoquer une variation du potentiel d'action sous l'influence de changements conformationnels en relation avec des perturbations de la perméabilité sous l'influence de l'auxine et liées aux mouvements ioniques. Dans cette hypothèse, l'intervention des glycosphingolipides dans les propriétés physiologiques des membranes devient beaucoup plus fascinante quand on examine deux de leurs propriétés, telles que leur faible perméabilité aux ions et leur capacité d'excitabilité et de conduction.

### CONCLUSION GENERALE

Hétérogènes dans leur structure, les glycosphingolipides neutres doivent l'être dans leurs activités. C'est cette hypothèse que ce travail a essayé d'étayer dans le cadre d'un processus physiologique actif : l'incompatibilité de fécondation.

Cette démarche a été limitée dans un premier temps à l'étude des glycosphingolipides neutres. La comparaison des résultats de l'analyse des acides gras, des bases à longue chaîne dans les céramides, mono, di, tri et tétraglycosylcéramides ainsi que celle de la copule osidique des mono et diglycosylcéramides s'est révélée intéressante par leur distribution dans les pollens et les styles, par les variations quantitatives et qualitatives de leur composition en relation avec la pollinisation. Les glycosphingolipides sont essentiellement connus comme constituants de la membrane ; nos résultats montrent que ce sont également des témoins du métabolisme stylaire qui manifeste des aspects différents, selon que l'on étudie des styles xénopollinisés ou autopollinisés. Mais l'importance de ces résultats réside notamment dans le fait qu'ils permettent de démontrer une participation directe aux activités physiologiques de la membrane au cours de la pollinisation ; participation qui peut être étendue parce qu'elle est un trait général.

Les résultats obtenus concernent en effet leur participation au métabolisme stylaire. Elle est particulièrement évidente dans l'analyse du métabolisme qui découle de la pollinisation. En effet, les variations de leur composition reflètent le métabolisme perturbé qui caractérise les styles autopollinisés et qui sera déterminant dans l'inhibition de croissance du tube pollinique incompatible.

La comparaison des effets de la pollinisation sur la composition des constituants des glycosphingolipides, montre qu'acides gras et bases à longue chaîne sont les témoins de l'exaltation du catabolisme respiratoire générateur d'énergie. Mais ces comparaisons nous conduisent à accorder tout particulièrement aux bases à longue chaîne, une influence certaine dans l'installation d'un métabolisme très localisé et nouveau qui va aboutir dans les tissus stylaires au développement d'une nouvelle orientation des corrélations entre activités auxiniques et activités enzymatiques (synthétases et transglycosylases). Ceci expliquerait les caractères particuliers des parois des tubes polliniques épaisses et à fort dépôt callosique, coïncidant avec l'inhibition de leur croissance.

Les changements de l'activité enzymatique relèvent souvent des variations de l'environnement ionique or, ces altérations du schéma de la biosynthèse des parois suggèrent que ces processus doivent être liés à des modifications de la perméabilité des membranes.

Il semble possible de faire intervenir des interrelations complexes entre structure moléculaire et propriétés des glycosphingolipides membranaires aux ions et les corrélations connues entre auxines, perméabilités, enzymes et croissance de la paroi. Membranes et auxines se réguleraient réciproquement, l'altération de la perméabilité membranaire relèverait du transfert lent d'une information qui reposerait sur la reconnaissance du génotype pollinique.

De plus, les glycosphingolipides comprennent, dans leur molécule, une copule osidique. On sait que ces chaînes oligosaccharidiques sont souvent impliquées dans des réactions de reconnaissance. Il convient de rappeler ici quelques exemples qui conduisent à admettre un certain parallélisme entre différents systèmes biologiques où notamment la structure des glycosphingolipides est déterminante dans l'accomplissement de la fonction de reproduction.

Ainsi, chez certaines levures ou chez les gamètes de *Chlamydomo*nas, une complémentarité est reconnue et nécessaire entre les substances spécifiques du sexe (CRANDALL et coll., 1974 ; WIESE et coll., 1972). Une liaison phages - lipopolysaccharides des Salmonelles s'avère également indispenseble lors de la réplication des phages (ROBBINS et coll., 1962). On connaît l'existence de lectines spécifiques et de récepteurs membranaires localisés sur les membranes plasmiques de certaines moisissures avant leur agrégation (REITHERMAN et coll., 1975). Enfin, chez l'homme, la définition et l'intégrité d'une structure membranaire du spermatozoïde sont indispensables au maintien de leur capacité de fertilisation (CLEGG et coll., 1974).

Dans chacun de ces systèmes biologiques, la structure membranaire est déterminante ; une homologie ou une complémentarité de structure sont indispensables à la reconnaissance, à l'adhésion et à la coopération métabolique. Dans ces trois processus, les glycosphingolipides sont impliqués soit par leur partie hydrophile (osidique) soit par leur partie hydrophobe.

Le signal électrique de reconnaissance suppose l'existence d'une molécule réceptrice du signal puis le transfert de ce signal. Il est évident que l'expression moléculaire de cette réception et de son transfert doit être précisée. Il s'avère tout aussi indispensable de déterminer le rôle exact des glycosphingolipides dans la réaction de reconnaissance (premier stade de la fertilisation), et d'approfondir la structure des glycosphingolipides acides et des glycosphingolipides à longue chaîne polysaccharidique.

124

Les résultats obtenus sont encourageants par les perspectives qu'ils ouvrent sur la participation des glycosphingolipides dans le processus d'incompatibilité. Il est évident que nous devons savoir si les modifications observées sont la cause ou l'effet de cette réaction d'autoincompatibilité.

De nombreuses incertitudes subsistent révélées par l'abondance des hypothèses avancées dans la discussion de ces résultats. Une meilleure définition des structures lipidiques membranaires, des relations de la membrane avec la réception et le transfert d'un signal lent doit être abordée. Ces recherches constitueront l'objet de nos prochaines investigations dans ce problème particulièrement important de la biologie que représente l'incompatibilité.

### BIBLIOGRAPHIE

- ADAMS E.P. et GRAY G.M., 1967 The structure of the oligosaccharides moieties of pig lung glycolipids. *Chem. Phys. Lipids*, 1, 368-375.
- AHOKAS H., 1976 Evidence of pollen esterase capable of hydrolyzing sporopollenin. Experientia, 32, 175-178.
- ARASU N.N., 1968 A gene action model to explain gametophytic self -incompatibility. *Genetica*, 39, 1-24.
- ASCHER P.D., 1966 A gene action model to explain gametophytic self-incompatibility. *Euphytica*, 15, 179-183.
- ASSMANN G. et STOFFEL W., 1972 Metabolism of sphingosine bases. XIX. On the origine of phytosphingosine in mammalian tissues. *Hoppe-Seyler's* Z. Physiol. Chem., 353, 971-979.
- BALASUBRAMANIAN A.S. et BACHHAWAT B.K., 1965 Formation of cerebroside sulphate from 3'-phospho-adenosine-5'-phospho-sulphate in sheep brain. *Biochim. Biophys. Acta, 106, 218-220.*
- BANDURSKI S. et PISKORNIK Z., 1973 An indole 3 acetic acid ester of a cellulosic glucan. In : "Biogenesis of Plant Cell wall Polysaccharides, LOEWUS F., ed., Academic Press New York, London, 297-314.
- BARENHOLZ Y. et GATT S., 1968 Separation of sphingosine, dihydrosphingosine and phytosphingosine by chromatography on columns of silica gel. *Biochim. Biophys. Acta*, 152, 790-793.
- BARENHOLZ Y. et GATT S., 1968 Degradation of sphingosine, dihydrosphingosine and phytosphingosine in rats. *Biochemistry*, 7, 2603-2609.
- BARTSCH G.G., 1970 Glycolipid abnormalities in a myoclonic variant of late infantile anaurotic idiocy. J. Lipid Res., 11, 241-247.
- BATEMAN A.J., 1954 Self-incompatibility systems in angiosperms. II. Iberis amara. Heredity, 8, 305-332.
- BATEMAN A.J., 1955 Self-incompatibility systems in angiosperms. III. Cruciferae. *Heredity*, 9, 53-58.
- BRADY R.O., FORMICA J.V. et KOVAL G.J., 1958 The enzymatic synthesis of sphingosine. II. Further studies on the mechanism of the reaction. J. Biol. Chem., 233, 1072-1076.
- BREDEMEIJER G.M.M., 1970 Glutamate deshydrogenase in pollen and styles of Petunia hybrida. Acta bot. neerl., <u>19</u>, 481-487.
- BREDEMEIJER G.M.M., 1973 Peroxidases in un, self and cross pollinated tobacco styles. *Incompatibility Newsletter*, 3, 55-57.
- BREDEMEIJER G.M.M., 1975 The effect of peroxidase on pollen germination and pollen tube growth in vitro. *Incompatibility Newsletter*, 5, 34-39.
- BRETT C.T. et NORTHCOTE D.H., 1975 The formation of oligoglucans linked to lipid during synthesis of β-glucan by characterized membrane fractions isolated from peas. *Biochem. J.*, 148, 107-117.
- BREWBAKER J.L., 1957 Pollen cytology and incompatibility systems in plants. J. Hered., 48, 271-277.
- BREWBAKER J.L., 1971 Pollen enzymes and isoenzymes. In : "Pollen development and physiology", J. HESLOP-HARRISON ed., London Butterworths, 156-170.
- BROOKS J. et SHAW G., 1971 Pollen development and physiology. J. HESLOP-HARRISON ed., London Butterworths, 99-114.
- BURNET F.M., 1971 "Self-recognition" in colonial marin forms and flowering plants in relation to the evolution of immunity. *Nature*, <u>232</u>, <u>230-235</u>.
- CARON B., 1972 Phospholipides et glycolipides du pollen et du style chez Oenothera missouriensis Sims. espèce auto-incompatible. Thèse d'Etat en Pharmacie, Lille.
- CARTER H.E., BETTS B.E. et STROBACH D.R., 1964 Biochemistry of the sphingolipids. XVII. The nature of the oligosaccharide component of phytoglycolipid. *Biochemistry*, 3, 1103-1107.
- CARTER H.E., JOHNSON P. et WEBER E.J., 1965 Glycolipids. Ann. Rev. Biochem., 34, 109-142.
- CARTER H.E. et GAVER R.C., 1967 Improved reagent for trimethylsililation of sphingolipid base. J. Lip. Res., 8, 391-395.

- CARTER H.E., STROBACH D.R. et HAWTHORNE J.N., 1969 Biochemistry of sphingolipids. XVIII. Complete structure of tetrasaccharide phytoglycolipid. *Biochemistry*, 8, 383-388.
- CHANGEUX J.P. et THIERY J., 1968 Regulatory fonctions of biological membrans. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 57, 334-341.
- CHEN TSAY G. et DAWSON G., 1976 Oligosaccharide storage in braine from patients with fucosidosis, GM<sub>1</sub> gangliosidosis and GM<sub>2</sub> gangliosidosis (sandhoff's disease). J. of Neurochemistry, 27, 733-741.
- CLARKE A.E., HARRISON S. et KNOX R.B., 1978 Plant cell recognition : glycoproteins from pollen wall sites and stigma surface of Gladiolus. Communication au 9ème Symposium International de Londres.
- CLARKE J.T.R., STOLZ J.M. et MULCAHEY M.R., 1976 The neutrol glycosphingolipids of serum lipoproteins in Fabry's disease. *Biochim. Biophys. Acta*, 431, 317-325.
- CLEGG E.D., MORRE D.J. et LUNSTRA D.D., 1975 Porcine sperm membran : in vivo phospholipid changes : isolation and electron microscopy. In : "Biology of the male gamete", DUCKETT J.G. et RACEY P.A., ed. Academic Press London, 321-335.
- CLELAND W.W. et KENNEDY E.P., 1960 The enzymatic synthesis of psychosine. J. Biol. Chem., 235, 45-51.
- COLES L., HAY J.B. et GRAY G.M., 1970 Factors affecting the glycosphingolipids composition of murine tissues. J. Lipid Res., 11, 158-163.
- CONNELL D.W., 1964 Volatile flavouring constituents of the pineapple. Australian J. Chem., 17, 130.
- CORRENS C., 1913 Selbsterilität und Individualstoffe. Biol. Zentralbl., 33, 389-423.
- COUSTAUT D. et LINDER R., 1977 Fatty acids of pollen and styles in Oenothera missouriensis Sims. self-incompatible species. C.R. Acad. Sci., Paris (D), 284, 1071-1075.
- CRANDALL M., LAUWRENCE L.M. et SAUNDERS R.M., 1974 Molecular complementarity of yeast glycoprotein mating factors. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, <u>71</u>, 26-29.
- CRESTI M. et Van WENT J.L., 1977 Callose deposition and plug formation in Petunia pollen tubes in situ. Planta, 133, 35-40.
- DARWIN C., 1876 Effects of cross and self fertilization in the vegetable kingdom. Ed. 2, New York, APPLETON D., ed.
- DAVIES M.D. et DICKINSON D.B., 1972 Properties of uridine-diphosphoglucose dehydrogenase from pollen of Lillium Longiflorum. Arch. Biochem. Biophys., 152, 53.

- DAVIS M.T. et SILBERT D.F., 1974 Changes in cell permeability following a marked reduction of saturated fatty acid content of Escherichia coli K12. Biochim. Biophys. Acta, 373, 224-241.
- DAWSON R.M.C., 1967 Analysis of phosphatides and glycolipids by chromatography of their partial hydrolysis or alcoholysis products. In: "Lipid chromatographic analysis, MARINETTI G.V., ed., M. Dekker inc New York, 1, 163-189.
- DAWSON G. et OH J.Y., 1977 Blood glycosylceramide levels in Gaucher's disease and its distribution amongst lipoprotein fractions. *Clin. Chim. Acta*, 75, 149-154.
- DEURENBERG J.J.M., 1976a In vitro protein synthesis from unpollinated, crossand self-pollinated Petunia ovaries. Planta, <u>128</u>, 29-33.
- DEURENBERG J.J.M., 1976b Activation of protein synthesis in ovaries from Petunia hybrida after compatible and incompatible pollination. Acta Bot. Neerl., 25, 221-226.
- DEURENBERG J.J.M., 1977 Evidence against the formation of fast diffusing substances preceding fertilization in Petunia. Acta Bot. Neerl., 26, 353-355.
- DICKINSON H.G. et DAVIES D., 1971 Metabolism of germinating lily pollen : pollen enzymes. In : "Pollen development and physiology" HESLOP-HARRISON J., ed., London Butterworths, 190-193.
- DICKINSON H.G. et LAWSON J., 1975 Pollen tube growth in the stigma of Oenothera organensis following compatible and incompatible intraspecific pollinations. Proc. Roy. Soc. London, 188, 327-345.
- DICKINSON H.G. et LEWIS D., 1975 Interaction between the pollen grain coating and the stigmatic surface during compatible and incompatible intraspecific pollinations in Raphanus. In : "The biology of the male gamete" DUCKETT J.G. et RACEY P.A., ed., Academic Press London, 165-177.
- EAST E.M., 1915 The phenomenon of self sterility. Am. Nat., 49, 76-87.
- EAST E.M., 1929 Self sterility. Bibl. Genet., 5, 331-370.
- EAST E.M. et MANGELSDORF A.J., 1925 A new interpretation of the hereditary behaviour of self sterile plants. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, <u>11</u> 166-171.
- FATHIPOUR A., SCHLENDER K.K. et SELL H.M., 1967 The occurrence of fatty acids methyl esters in the pollen of Zea mays. Biochim. Biophys. Acta, 144, 476-480.

- FILZER P., 1926 Die selbst sterilität von Veronica syriaca. Zeit. ind abst. Vererb., 41, 137.
- FOLCH J., LEES M., SLOANE S. et STANLEY G.H., 1957 A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. J. Biol. Chem., 226, 497-509.
- FOURNET B., FIAT A.M., MONTREUIL J. et JOLLES P., 1975 The sugar part of α-caseins from cow milk and colostrum and its microheterogeneity. *Biochimie*, 57, 161-165.
- FRIEDMAN K.J., 1977 Role of lipids in the Neuropora crassa membran. II. Membran potential and resistance studies. The effect of altered fatty acids composition on the electrical properties of the cell membran. J. Membrane Biology, 36, 175-190.
- GAGNIEU A., 1950 L'incompatibility chez les plantes supérieures : Problèmes de génétique végétale. Ann. Biol., 26, 3-4.
- GARDAS A., 1976 A structural study on a macro-glycolipid containing 22 sugars isolated from human erythrocytes. Eur. J. Biochem., 68, 177-185.
- GATT S. et BARENHOLZ Y., 1968 Degradation of sphingosine bases by cell free preparation : α-hydroxy palmitic acid, an intermediate of phytosphingosine degradation. Biochem. Biophys. Res. Commun., 32, 588-594.
- GAVER R.G. et SWEELEY C.C., 1965 Methods for methanolysis of sphingolipids and direct determination of long chain bases by gaz liquid chromatography. J. Amer. oil Chem. Soc., 42, 294-298.
- GREEN G., 1967 In : "Les membranes protoplasmiques". Collection structures et fonctions cellulaires, DOIN, ed., 1971.
- GUNSTONE F.D., 1975 Determination of the structure of fatty acids. Proceeding of the phytochemical Society : Recent advances in the chemistry and biochemistry of plant lipids. GALLIARD T. et MERCER E.I., ed., Academic Press, 12, 21-42.
- HAJRA A.K., BOWEN D.M., KISHIMOTO Y. et RADIN N.S., 1966 Cerebrosid galactosidase of brain. J. Lipid Res., 7, 379-386.
- HAMARSTROM S., SAMUELSON B. et SAMUELSON K., 1970 Gaz liquid chromatographymass spectrometry of synthetic ceramides containing 2 hydroxyacids. J. Lipid Res., <u>11</u>, 150-157.
- HAMARSTROM S., 1971 On the biosynthesis of cerebrosides containing non hydroxy-acids. Biochem. Biophys. Res. Commun., 45, 459-467.
- HASLAM J.M., SPITHILL T.M., LINNANE A.N. et CHAPPELL J.B., 1973 The effects of altered membrane lipid composition on cation transport by mitochondria of Saccharomyces cereviseae. Biochem. J., 134, 949-957.

- HAYWARD D.M., DASHEK W.V. et MILLS R.R., 1973 Lilly pollen peroxidase. Incompatibility Newsletter, 2, 33-35.
- HESLOP-HARRISON J., 1968 Tapetal origin of pollen coat substances in Lilium. New Phytol., 67, 779-786.
- HESLOP-HARRISON J., 1972 Sporopollenin in the biological context. In : "Sporopollenin", BROOKS J. et coll., ed., Academic Press, London New York, 1-30.
- HESLOP-HARRISON J., HESLOP-HARRISON Y., KNOX R.B. et HOWLETT B.J., 1973 Pollen wall proteins "gametophytic and sporophytic" fractions in the pollen walls of the Malvaceae. Ann. Bot., 37, 403-412.
- HESLOP-HARRISON J., KNOX R.B., HESLOP-HARRISON Y. et MATTSON O., 1975 Pollen wall proteins, emission and role in incompatibility responses. In : "The biology of the male gamete", DUCKETT J.G. et RACEY P.A., ed., Academic Press, London, 189-204.
- HESLOP-HARRISON J., HESLOP-HARRISON Y. et BARBER J., 1975 The stigma surface in incompatibility responses. Proc. Roy. Soc. London, 188, 287-299.
- HESLOP-HARRISON J., 1975 Incompatibility and the pollen stigma interaction. Ann. Rev. Plant Physiol., 26, 403-425.
- HIRVISALO E.L. et RENKONEN 0., 1970 Composition of human serum sphingomyelins. J. Lipid Res., 11, 54-59.
- HITCHCOCK C., 1975 Structure and distribution of plant acyl lipids. In : "Proceeding of the phytochemical society : recent advances in chemistry and biochemistry of plant lipids, GALLIARD T. et MERCER E.I., ed., Academic Press, 12, 1-19.
- HITCHCOCK C. et NICHOLS B.W., 1975 Plant acyl lipids. In : "Plant lipid biochemistry, HITCHCOCK C. et NICHOLS B.W., ed., Academic Press, London and New York, 43-58.
- HOPPER J.E. et DICKINSON D.B., 1972 Partial purification and sugar nucleotide inhibition of UDP-glucose-phosphorylase from Lilium longiflorum. Arch. Biochem. Biophys., 148, 523-535.
- HOWLETT B.J., KNOX R.B. et HESLOP-HARRISON J., 1973 Pollen wall proteins : Release of the allergen antigen E from intine and exine sites in pollen grains of Raqueed and Cosmos. J. Cell Sci., 13, 603-619.
- HOWLETT B.J., KNOX R.B., PAXTON J.D. et HESLOP-HARRISON J., 1975 Pollen wall proteins : physicochemical characterization and role in self-incompatibility in Cosmos bipinnatus. Proc. Roy. Soc. London, 188, 167-182.
- HUGHES M.B. et BABCOCK E.B., 1950 Self-incompatibility in Crepis foetida. Genetics, 35, 570-588.

- KANO I. et YAMAKAWA T., 1974 The properties of α-galactosidase remaining in kidney and liver of patients with Fabry's disease. Chem. Phys. Lipids, 13, 283-291.
- KARAN K. et LESTER R.L., 1975 Characterization of inositol containing phosphosphingolipids from tobacco leaves. Isolation and identification of 2 novel major lipids. *Plant Physiol.*, 55, 120-129.
- KARLSSON K.A., SAMUELSSON B.E. et STEEN G.O., 1968 Structure and function of glycosphingolipids. Difference in glycosphingolipid concentration, especially concerning sulfatides between some regions of bovine kidney. Acta Chem. Scand., 22, 2723-2724.
- KARLSSON K.A. et MARTENSSON E., 1968 Studies on sphingosines. XIV : On the phytosphingosine content of the major human kidney glycolipids. Biochim. Biophys. Acta, 152, 230-233.

KARLSSON K.A. et STEEN G.O., 1968 - Studies on sphingosines. XIII : The existence of phytosphingosine in bovine kidney sphingomyelins. Biochim. Biophys. Acta, 152, 798-800.

- KARLSSON K.A., 1970 On the chemistry and occurence of sphingolipid long chaine bases. Chem. Phys. Lipids, 5, 6-43.
- KARLSSON K.A., 1971 Sphingolipid long chain bases. Lipids, 5, 878-891.
- KARLSSON K.A., SAMUELSSON B.E. et STEEN G.O., 1972 Identification of a xylose containing cerebroside in the salt gland of the herring gull. J. Lipid Res., 13, 169-176.
- KARLSSON K.A., SAMUELSSON B.E. et STEEN G.O., 1973 Separation of monoglycosylceramides, and cerebrosides of bovine kidney into subgroups and characterization by mass spectrometry. *Biochim. Biophys. Acta*, 306, 317-328.
- KARLSSON K.A., SAMUELSSON B.E. et STEEN G.O., 1973 Sphingolipid composition of bovine kidney cortex, medulla and papilla. *Biochim. Biophys.* Acta, 316, 317-335.
- KARLSSON K.A., SAMUELSSON B.E. et STEEN G.O., 1973 Detailed structure of sphingomyelins and ceramides from different regions of bovine kidney with special reference to long chain base. *Biochim. Biophys.* Acta, 316, 336-362.
- KATES M., 1972 In techniques in lipidology isolation, analysis and identification of lipids. WORK T.S. et WORK E., ed., North Holland american elsevier.
- KNOX R.B. et HESLOP-HARRISON J., 1969 Cytochemical localisation of enzymes in the wall of the pollen grain. *Nature*, 223, 92-95.

- KNOX R.B. et HESLOP-HARRISON J., 1970 Localization of Antigens associated with the pollen grain wall by immunofluorescence. *Nature*, 225, 1066-1068.
- KNOX R.B. et HESLOP-HARRISON J., 1970 Pollen wall proteins : localization and enzymic activity. J. Cell Sci., <u>6</u>, 1-27.
- KNOX R.B., 1971 Pollen wall proteins : localization and antigenic activity during development in Gladiolus (Iridaceae). J. Cell Sci., 9, 209-237.
- KNOX R.B., WILLING R.R. et ASHFORD A.E., 1972 Role of pollen wall proteins as recognition substances in interspecific incompatibility in poplars. Nature, 237, 381-383.
- KNOX R.B., HESLOP-HARRISON J. et HESLOP-HARRISON Y., 1975 Pollen wall proteins : localization and characterization of gametophytic and sporophytic fractions. In : "The Biology of the male gamete", DUCKETT J.G. et RACEY P.A., ed., Academic Press, London, 177-187.
- KONAR R.N et LINSKENS H.F., 1966 Physiology and biochemistry of the stigmatic fluid in Petunia hybrida. Planta, 71, 372-387.
- KONAR R.N. et STANLEY R.G., 1969 Wall softening enzymes in the gynoecium and pollen of Hemerocallis fulva. Planta, 84, 304-310.
- KRIVIT W. et HAMMARSTROM S., 1972 Identification and quantitation of free ceramides in human platelets. J. Lipid Res., 13, 525-530.
- KROES H.W., 1973 An enzyme theory of self-incompatibility. Incompatibility Newsletter, 2, 5-14.
- KROH M., 1964 An electron microscopy study of the behaviour of Cruciferae pollen after pollination. In : "Pollen physiology and fertilization", LINSKENS H.F., ed., Amsterdam North Holland, 221-224.
- KWITEROVICH P.O., SLOAN H.R. et FREDRICKSON D.S., 1970 Glycolipids and other lipids constituents of normal human liver. J. Lipid Res., 11, 322-330.
- LABARCA C., KROH M., LOEWUS F., 1970 The composition of the stigmatic exudate from Lilium longiflorum. Plant Physiol., 46, 150-156.
- LAMPORT D.T.A., 1965 In : "Advances in botanical research", PRESTON R.D., ed., Academic Press New York, 2, 152-218.
- LESTER R.L., SMITH S.W., WELLS, G.B., REES, D.G. et ANGUS W.W., 1974 The isolation and partial characterization of 2 novel sphingolipids from Neurospora crassa (inositol-P)<sub>2</sub>-ceramide and (Gal)<sub>3</sub>-Gluceramide. J. Biol. Chem., <u>249</u>, 3388-3394.

- LEWIS D., 1954 Comparative incompatibility in angiosperms and fungi. Adv. Genet., 6, 235-285.
- LEWIS D., 1960 Genetic control of the specificity and activity of the Santigen in plants. Proc. Roy. Soc. London, 151, 468-477.
- LEWIS D., 1965 A protein dimer hypothesis on incompatibility. Genetics to day, 3, 657-663.
- LEWIS D., BURRAGE S. et WALLS D., 1967 Immunological reactions of single pollen grains electrophoresis and enzymology of pollen protein exudates. J. exp. Bot., 18, 374-378.
- LINDER R., 1957 Etude génétique de mécanismes qui limitent la fertilité dans Oenothera missouriensis et Denothera fructicosa. Ann. Biol., 30, 501-518.
- LINDER R., 1967 Aspects du déterminisme génétique de l'incompatibilité. Colloque RCP 115, C.N.R.S., 3-6.
- LINDER R. et LINSKENS H.F., 1972 Evolution des acides aminés dans le style d'Oenothera missouriensis vierge, autopollinisé et xénopollinisé. Theoret. app. Genetics, 42, 125.
- LINDER R. et COUSTAUT D., 1966 Bilan des acides aminés dans le pollen et le style chez une espèce autoincompatible Oenothera missouriensis. C.R. Acad. Sci., Paris (D), 263, 1447-1450.
- LINSKENS H.F., 1965 Biochemistry of incompatibility. Genetics to day, 3, 621-636.
- LINSKENS H.F. et KROH M., 1967 Inkompatibilität der Phanerogamen. Encycl. Plant Physiol., 18, 506-530.

LINSKENS H.F., HAVEZ R., LINDER R., SALDEN M., RANDOUX A., LANIEZ D et COUSTAUT D., 1969 - Etude des glycannes hydrolases au cours de la croissance du pollen chez Petunia hybrida auto-incompatible. C.R. Acad. Sci., Paris (D), 269, 1855-1857.

LINSKENS H.F., LINDER R., SALDEN M., HAVEZ R., RANDOUX A., LANIEZ D. et COUSTAUT D., 1970 - Etude des glycoprotéines et des glycannes hydrolases au cours de la pollinisation chez *Petunia hybrida* auto-incompatible. *Bull. Soc. Pharm. Lille*, <u>1</u>, 1-16.

LINSKENS H.F. et SPANGERS A.W., 1973 - Changes of the electrical potentiel in the transmitting tissue of *Petunia* styles after cross- and selfpollination. *Incompatibility* Newsletter, 3, 81-85.

LINSKENS H.F., 1974 - Fertilization in higher plants. North Holland American, Elsevier.

- LINSKENS H.F., 1975 The physiological basis of incompatibility in angiosperms. In : "The biology of the male gamete", DUCKETT J.G. et RACEY P.A., ed., Academic Press, London, 143-152.
- LUNDQUIST A., 1955 Genetics of self-incompatibility in Festuca pratensis Huds. Hereditas, 40, 278-294.
- LUNDQUIST A., 1962 The nature of the two loci incompatibility system in grasses. I. The hypothesis of a duplicative origin. *Hereditas*, <u>48</u>, 153-168.
- LUNDQUIST A., 1975 Complex self-incompatibility systems in angiosperms. Proc. Roy. Soc. London, 188, 235-247.
- MAKINEN Y.L.A. et LEWIS D., 1962 Immunological analysis of incompatibility S-proteins and of cross reacting material in self-compatible mutant of Oenothera organensis. Genet. Res., 3, 352-363.
- MAKINEN Y.L.A. et BREWBAKER J.L., 1967 Isoenzyme polymorphism in flowering plants. I. Diffusion of enzymes out of intact pollen grains. *Physiol. Plant, 20, 477-482.*
- MARTENSSON E., 1966 Sulfatides of human kidney isolation, identification and fatty acids composition. *Biochim. Biophys. Acta*, <u>116</u>, 521-531.
- MARTENSSON E., 1969 Glycosphingolipids of animal tissue. Progr. Chem. Fats other lipids, 10, 365-407.
- MARTIN F.W., 1968 Some enzymes of the pollen and stigma of the sweet potato. Phyton, 25, 97-102.
- MATTSSON O., KNOX R.B., HESLOP-HARRISON J. et HESLOP-HARRISON Y., 1974 Protein pellicle of stigmatic papillae as probable recognition site in incompatibility reaction. *Nature*, 247, 298-300.
- MENDERSHAUSEN P.B. et SWEELEY C.C., 1969 Chemistry and metabolism of sphingolipids. Chemical synthesis of 2-amino-1-hydroxy-octadecan-3-one (3-Ketosphinganine). *Biochem.*, 8, 2633.
- MORELL P. et BRAUN P., 1972 Biosynthesis and metabolic degradation of sphingolipids not containing sialic acid. J. Lipid. Res., 13, 293-310.
- MRAZ W., FISCHER G. et JATZKEWITZ H., 1976 The activator of cerebroside sulphatase : lysosomal localization. Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., 357, 1181-1193.
- MRAZ W. et JATZKEWITZ H., 1976 Cerebroside sulphatase activity of arylsulphatase (acidic forms) from invertebrates in the absence of activators. Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., 357, 1193-1197.
- NAOI M., LEE Y.C. et ROSEMAN S., 1974 Rapid and sensitive determination of sphingosine base and sphingolipid with fluorescamine. Anal. Biochem., 58, 571-577.

- NETTANCOURT (de) D., 1972 Self-incompatibility in basic and applied researches with higher plants. *Genetica Agraria*, 26, 163-216.
- OKADA S. et O'BRIEN J.S., 1969 Tay Sachs disease : generalized absence of a β-D-N- acetyl hexosaminidase component. *Science*, 165, 698-700.
- OSADA Y. et OGAWA H., 1977 A possible role of glycolipids in epithelial cell penetration by virulent Shigella. Microbiology-Immunology, 21, 405-411.
- PANDEY K.K., 1957 Genetics of incompatibility in Physalis ixocarpa Brot. A new system. Amer. J. Bot., 44, 879-887.
- PANDEY K.K., 1967 Origin of genetic variability : combinations of peroxidase isozymes determine multiple allelism of the S-Gene. *Nature*, <u>213</u>, 669-672.
- PANDEY K.K., 1972 Isoenzyme specificity to temperature. Nature, 239, 27-29.
- PANDEY K.K., 1975 Model for incompatibility determination in flowering plants. Incompatibility Newletter, 6, 70-73.
- PILET P.E., 1971 Les parois cellulaires. In : "Collection structures et fonctions cellulaires", DOIN, ed.
- RAPPORT M.M. et GRAF L., 1969 Immunochemical reactions of lipids. Progr. Allergy, 13, 273-331.
- REITHERMAN R.W., ROSEN S.D., FRAZIER W.A. et BARONDES S.H., 1975 Cell surface species-specific high affinity receptors for discoidin : developmental regulation in Dictyostelium discoideum. Proc. Nat. Acad. Sci., 72, 3571-3545.
- RILEY H.P., 1936 Self sterility in Capsella. Genetics, 21, 24-39.
- ROBBINS P.W. et UCHIDA T., 1962 Studies on the chemical basis of the phage conversion of O-Antigens in the E-group Salmonella. Biochemistry, 1, 323-335.
- ROGGEN H.P.J.R., 1967 Changes in enzymes activities during the progame phase in Petunia hybrida. Acta Bot. Neerl., 16, 1-31.
- ROGGEN H.P.J.R. et STANLEY R.G., 1969 Cell wall hydrolysing enzymes in wall formation as measured by pollen tube extension. *Planta*, 84, 295-303.
- ROUSER G., KRITCHEVSKY G. et YAMAMOTO A., 1967 Column chromatography and associated procedures for separation and determination of phosphatides and glycolipids. In : "Lipid chromatographic analysis, MARINETTI G.V., ed., DEKKER M. inc New York, 1, 99-162.
- SAMBASIVARAO K. et Mac CLUER R.H., 1963 Thin layer chromatographic separation of sphingosine and related bases. J. Lipid Res., 4, 106-108.

- SAMPSON D.R., 1957 The genetics of self-incompatibility in the radish. J. Heredity, 48, 26-29.
- SAMPSON D.R., 1962 Intergeneric pollen stigma incompatibility in the Cruciferae. Can. J. Genet. Cytol., 4, 38-49.
- SAMUELSSON K. et SAMUELSSON B., 1970 Gas chromatographic and mass spectrometric studies of synthetic adn naturally occurring ceramides. *Chem. Phys. Lipids*, 5, 44-79.
- SEARS E.R., 1937 Cytological phenomena connected with self-sterility in the flowering plants. *Genetics*, 22, 130.
- SHAPIRO D., 1969 Chemistry of sphingolipids. HERMANN, ed., Paris.
- SHAW G., 1971 In : "Sporopollenine". BOOKS J., GRANT P.R., MUIR M, VAN GIJZEL P. et SHAW G., ed., London Academic Press, 305.
- SHIMOJO T., AKINO T., MIURA Y. et SHROEPFER G.J., 1976 Sphingolipid base metabolism stereospecific uptake of proton in the enzymatic conversion of sphinganine 1-phosphate to ethanolamine 1-phosphate. J. Biol. Chem., 251, 4458-4467.
- SLOMIANY B.L. et SLOMIANY A., 1977 Structural studies on branched fucosphingolipids of hog gastric mucosa. Chem. Phys. Lipids, 20, 57-70.
- SMITH E.L., Mac KIBBIN J.M., BREIMER M.E., KARLSSON K.A., PASCHER I. et SAMUELSSON B.E., 1975 - Identification of a novel hepta glycosyl ceramide with 2 fucose residues and a terminal hexosamine. *Biochem. Biophys.* Acta, 398, 84.
- SMITH S.W. et LESTER R.L., 1974 Inositol phosphoryl ceramide : a novel substances and the chief member of a major group of yeast sphingolipids containing a single inositol phosphate. J. Biol. Chem., 249, 3395-3405.
- STANLEY R.G. et LINSKENS H.F., 1965 Protein diffusion from germinating pollen. Physiol. Plant., 18, 47-53.
- STANLEY R.G. et LINSKENS H.F., 1967 Oxygen tension as a control mechanism in pollen tube rupture. *Science*, 157, 833-834.
- STOFFEL W., LE KIM D. et STICHT G., 1968 Biosynthesis of dihydrosphingosine in vitro. Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., 349, 664-670.
- STOFFEL W., LE KIM D. et HEYN G., 1970 Metabolism of sphingosine bases. XIV. Sphinganine (dihydrosphingosine) an effective donor of the alk 1'enyl chain of plasmalogens. Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., 351, 875-883.

STOFFEL W., 1971 - Sphingolipids. Ann. Rev. Biochem., 40, 57-82.

- STOFFEL W., 1976 Studies on the biosynthesis and degradation of sphingosine bases. Chem. Phys. Lipids, 5, 139-158.
- STOFFYN A., STOFFYN P. et MARTENSSON E., 1968 Structure of kidney ceramide dihexoside sulphate. *Biochim. Biophys. Acta*, 152, 353-357.
- STOFFYN P., STOFFYN A. et HAUSER G., 1971 Structure of sulfatides biosynthesized in vitro. J. Lipid Res., 12, 318-323.
- STOUT A.B., 1922 Cyclic manifestation of sterility in Brassica pekinensis and Brassica chinensis. Bot. Gaz, 2, 73-77.
- STOWE B.B., 1960 Growth promotion in pea stem sections stimulation of auxin and gibberellin action by alkyl lipids. *Plant Physiol.*, 35, 262.
- STRAUB J., 1947 Selbststerilität von Petunia. Zeitschr. Naturforschung, 126.
- SUGITA M., DULANEY J.T. et MOSER H.W., 1974 Structure and composition of sulfatides isolated from livers of patients with metachromatic leukodystrophy : gal-sulfatide and lactosyl-sulfatide. J. Lipid Res., 15, 227-233.
- SUZUKI K. et SUZUKI Y., 1970 Globoid cell leucodystrophy (Krabbe's disease) : deficiency of galactocerebroside β galactosidase. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 66, 302-309.
- SVENNERHOLM L., 1962 The chemical structure of normal human brain and Tay Sachs gangliosides. Biochem. Biophys. Res. Commun., 9, 436-441.
- TAO R.V.P., SWEELEY C.C. et JAMIESON G.A., 1973 Sphingolipid composition of human platelets. J. Lipid Res., 14, 16-25.
- THOMPSON K.F., 1957 Self-incompatibility in marrow-stem kale, Brassica cleracea var. acephala. I. Demonstration of a sporophytic system. J. Genet., 55, 45-60.
- TOWNSEND C.E., 1971 In : "Pollen development and physiology". HESLOP-HARRISON J., ed., London Butterworths, 281-309.

TSAI C.H. et HASSID W.Z., 1971 - Plant Physiol., 47, 740-744.

- TSINGER N.V. et PETROVSKAYA-BARANOVA T.P., 1961 The pollen grain wall. A living physiologically active structure. Dokl. Akad. Nauk. SSSR, 138, 466-469.
- TSO T.C., 1964 Plant growth inhibition by some fatty acids and their analogues. Nature, 202, 512-513.
- VANCE D.E. et SWEELEY C.C., 1967 Quantitative determination of the neutral glycosyl-ceramides in human blood. J. Lipid Res., 8, 621-630.

- VAN DEENEN L.L.M., 1972 Permeability and topography of membrane. Chem. Phys. Lipids, 8, 366.
- VAN DESSEL G., LAGROU A., HILDERSON H.J., DIERICK W. et DACREMONT G., 1977 -Quantitative determination of the neutral glycosyl-ceramides in bovine thyroid gland. *Biochimie*, 59, 839-848.
- VICKER M.G. et CRITCHLEY D.R., 1977 Glycolipids as cell surface receptors and their role in cell social behaviour. *Biochem. Soc. Transaction*, 5, 1695-1700.
- WATANABE K., MATSUBARA T. et ITIROH-HAKOMORI S., 1976 a-L fucopyranosylceramide : a novel glycolipid accumulated in some of the human colon tumors. J. Biol. Chem., 251, 2385-2388.
- WEISS B. et STILLER R.L., 1967 Biosynthesis of phytosphingosine hydroxylation of dihydrosphingosine. J. Biol. Chem., 242, 2903-2908.
- WIEGANDT H., 1971 Glycosphingolipids. Advance in Lipid Research, 9, 249-289.
- WIESE L. et HAYWARD P.C., 1972 On sexual agglutination and mating type substances in isogamous dioecious chlamydomonas. III. The sensitivity of sex cell contact to various enzymes. Amer. J. Bot., <u>59</u>, 530-536.
- WOJTCZAK L., 1974 Effect of fatty acids and acyl-Co-A on the permeability of mitochondrial membranes to monovalent cations. *Febs Lett.*, 44, 25-30.
- YAVIN E. et GATT S., 1969 Enzymatic hydrolysis of glycosphingolipids. VIII. Further purification and properties of rat brain ceramidase. Biochemistry, 8, 1692-1698.

# APPENDICE TECHNIQUE

# SOMMAIRE DES FICHES

$\mathcal{D}$	αQ	e

,

1	Matériel utilisé	T1
2	Extraction des lipides	T2
3	Hydrolyse alcaline douce. Obtention des glycosphingolipides	T4
4	Chromatographie d'adsorption sur colonne d'acide silicique	T6
5	Chromatographie d'échange ionique sur colonne de DEAE cellulose	T9
6	Chromatographie sur couche mince des glycosphingolipides	T'11
7	Purification des glycosphingolipides par chromatographie sur couche mince	T15
8	Couplage des diverses techniques et protocole de purification des glycosphingolipides	T17
9	Dosage fluorimétrique des glycosphingolipides	T18
10	Hydrolyse acide des glycosphingolipides	T21
11	Préparation des esters méthyliques d'acides gras	T23
12	Etude de la composition en acides gras par chromatographie gaz-liquide	T25
13	Etude de la composition en bases à longue chaîne des glycosphin-	T30
14	Etude de la composition en oses des glycosphingolipides	T39
	Bibliographie technique	<i>T41</i>

.

Les clônes W 166 K  $[S_1S_2]$  et  $T_2U [S_3S_3]$  de *Petunia hybrida* proviennent des serres de l'Université de Nimègue où ils sont maintenus et multipliés par le Professeur H.F. LINSKENS.

Dans le tableau ci-dessous sont consignés la nature (pollinique ou stylaire) du matériel, les génotypes ainsi que les différentes pollinisations qui seront analysées.

Nature du matériel	Clônes	Génotypes	Pollin compatibles	Temps (heure)	
pollen styles	W166K	s <sub>1</sub> s <sub>2</sub>	1) W166K. T <sub>2</sub> U [S <sub>1</sub> S <sub>2</sub> ]. [S <sub>3</sub> S <sub>3</sub> ]	1) W166K. W166K [S <sub>1</sub> S <sub>2</sub> ].[S <sub>1</sub> S <sub>2</sub> ]	8 h et 24 h
pollen styles	T₂u	\$ <sub>3</sub> \$ <sub>3</sub>	2) T <sub>2</sub> U. W166K [S <sub>3</sub> S <sub>3</sub> ]. [S <sub>1</sub> S <sub>2</sub> ]	2) T <sub>2</sub> U. T <sub>2</sub> U [S <sub>3</sub> S <sub>3</sub> ].[S <sub>3</sub> S <sub>3</sub> ]	24 h

## FICHE 2 - EXTRACTION DES LIPIDES

d'après FOLCH J. et coll. - J. Biol. Chem., 1957, 226, 497-509 (T2) modifiée KARLSSON K.A. et coll. - Biochim. Biophys. Acta, 1973, <u>316</u>, 317-335 (T3).

#### INTRODUCTION

Selon la technique préconisée par FOLCH (1951-1955, T1-T2) les organes sont broyés mécaniquement dans le mélange chloroforme-méthanol 2/1 (v/v). Le méthanol dénature les protéines et le chloroforme favorise la mise en solution des lipides totaux. Après addition d'eau et agitation, on obtient un déphasage avec passage dans la phase hydro-alcoolique supérieure des substances hydrosolubles, la phase inférieure chloroformique renferme les lipides totaux.

Cependant, ce procédé d'extraction des lipides totaux est un facteur limitant dans l'étude des glycosphingolipides (GSL).

Il faut, semble-t-il, attribuer aux extractions incomplètes les discordances entre les résultats concernant la composition en GSL du rein (KARLSSON, 1973 (T3)), les conditions trop douces d'extraction, décrites par CARTER (1969 (T4)) ne conduiraient pas à une libération quantitative de l'ensemble des GSL. Les phytosphingolipides sont particulièrement difficiles à extraire et ne le sont que lors des dernières homogénéisations.

Les différentes techniques d'extraction proposées dérivent de celles de FOLCH (1951-1957 (T1-T2)).

En effet, le meilleur agent d'extraction (POLONOVSKY et coll., 1959 (T5)) reste le mélange CHCl<sub>3</sub>-CH<sub>3</sub>OH dans les proportions 2/1 (v/v). Seules les conditions de température varient : + 4°C, température ambiante (BARTSCH, 1970 (T6) ; KWITEROVICH et coll., 1970 (T7) ; SUGITA et coll., 1974 (T8)), mais également température élevée (HARWOOD-JAMES, 1975 (T9) ; KARLSSON, 1973 (T3), 1969 (T10) ; RAGHAVAN, 1974 (T11)).

Afin d'obtenir une extraction complète des GSL nous avons donc procédé de la manière suivante :



PROTOCOLE D'EXTRACTION



#### MATERIEL ET METHODES

1 - Réactifs :

- solvant d'extraction I:chloroforme/méthanol (2/1, v/v);

- solvant d'extraction II: chloroforme/méthanol (1/1, v/v);

- solution NaCl à 9 g/l ;

- solution de lavage :

chloroforme..... 3 volumes méthanol..... 47 volumes NaCl 9 %..... 48 volumes

#### 2 - Extraction :

Le matériel lyophilisé (2 g de styles ou 1 g de pollens) provenant des divers clônes et croisements est homogénéisé à l'aide d'un homogénéisateur Waring Blendor dans le solvant d'extraction I, à raison de 20 ml de solvant par gramme de tissu sec, pendant 20 minutes.

Après deux heures de contact à la température du laboratoire, l'extrait est filtré et le résidu est homogénéisé à 4 reprises à l'aide d'un appareil de Potter, dans le solvant d'extraction I, à raison de 10 ml de solvant par gramme de tissu. Après filtration, le résidu sec est chauffé à reflux pendant une heure dans le solvant II.

Les divers surnageants organiques sont réunis et soumis à un partage selon la technique de Folch par addition de 1 volume d'une solution de NaCl à 9 % pour 5 volumes de solvant. Après déphasage, une nuit à + 4°C, et élimination de la phase supérieure, la phase inférieure chloroformique est lavée par la solution CHCl<sub>3</sub>-CH<sub>3</sub>OH-NaCl 9 % 3-47-48 (v/v/v).

La phase inférieure contenant les lipides totaux est évaporée à sec. Les lipides sont ensuite repris dans un petit volume de solvant I et gardés à - 20°C sous atmosphère d'azote.

Deux extractions ont été réalisées pour chaque type de tissus en fonction du génotype, de la pollinisation incompatible et compatible (8 - 24 heures). Le protocole d'extraction utilisé est schématisé ci-contre (tableau TI).

FICHE 3 : HYDROLYSE ALCALINE DOUCE. OBTENTION DES GLYCOSPHINGOLIPIDES

KARLSSON K.A. et Coll. - Biochim. Biophys. Acta, 1973, 316, 317-335 (T3)

#### INTRODUCTION

Les GSL constituent une classe de lipides alcali-résistants. Les glycérophosphatides seront donc détruits par une saponification.

Le protocole opératoire comporte :

- une étape d'hydrolyse alcaline ;

- l'arrêt de cette hydrolyse par neutralisation de l'agent alcalin et acidification du milieu jusqu'à un pH compris entre 2 et 5 ;

- extraction des GSL par partage et élimination simultanée des molécules et sels hydrosolubles ;

- récupération de la phase organique contenant les GSL totaux.

Les divers protocoles opératoires proposés suivent tous ce schéma type ; seules la composition des réactifs et la durée de l'hydrolyse varient.

L'agent alcalin utilisé est soit :

- le méthoxyde de Na (RAGHAVAN, 1974 (T11));

- le méthoxyde de K (MORRISON, 1969 (T12));

- la soude (SUGITA et coll., 1974 (T8))

ou le plus souvent :

- la potasse (HIGASHI-HORI, 1968 (T13); KARLSSON, 1969 (T10), 1973 (T3); SVENNERHOLM et coll., 1972 (T14); TAMAI et coll., 1975 (T15).

La concentration de l'agent hydrolysé varie de :

- 0,1 M pour les conditions les plus douces (KARLSSON, 1969 (T10), 1973 (T3)
- à 1 M pour les conditions les plus drastiques (CARTER et coll., 1961 (T16);
HIGASHI-HORI, 1968 (T13); SVENNERHOLM et coll., 1972 (T14); TAMAI et coll., 1975 (T15)).

#### TABLEAU T2

# OBTENTION DES GLYCOSPHINGOLIPIDES TOTAUX



(BIIS)

Les temps d'hydrolyse s'échelonnent entre 20 minutes et 36 heures.

Nous avons utilisé la technique de SCHMIDT modifiée par KARLSSON (1973 (T3)) qui assure une hydrolyse complète et une oxydation minimale et dont le protocole est représenté ci-contre.

#### MATERIEL ET METHODES

#### 1 - Réactifs :

- Agent d'hydrolyse : KOH 0,1 M dans du méthanol aqueux (CH\_3OH H\_2O ; 9/1 ; v/v) ;
- HCl 2 M.

## 2 - Hydrolyse alcaline douce :(tableau TII)

Un gramme de lipides totaux sont repris dans 100 ml d'agent hydrolysent. L'hydrolyse se poursuit en atmosphère d'azote, à l'obscurité sous agitation magnétique et à la température du laboratoire pendant 18 heures.

Cette hydrolyse est arrêtée par addition lente de HCl 2 M jusqu'à un pH 2-3. L'addition de CHCl<sub>3</sub> et d'H<sub>2</sub>O jusqu'à des concentrations finales en CHCl<sub>3</sub> - CH<sub>3</sub>OH - H<sub>2</sub>O de 8,4,3 permet le déphasage selon la technique de FOLCH (1957, **T**2). Après élimination de la phase supérieure hydro-alcoolique, la phase inférieure contenant les GSL totaux est évaporée à sec. Les GSL sont repris par le mélange solvant CHCl<sub>3</sub> - CH<sub>3</sub>OH 2/1 v/v et sont conservés à -20°C sous atmosphère d'azote.

Une partie aliquote de la phase supérieure est soumise à une analyse par chromatographie en couche mince afin de vérifier l'absence de GSL dans cette phase.

#### FICHE 4 : CHROMATOGRAPHIE D'ADSORPTION SUR COLONNE D'ACIDE SILICIQUE

G. ROUSER - G. KRITCHEVSKY - A. YAMAMOTO, 1967 (T18) K.A. KARLSSON et coll. - Biochim. Biophys. Acta, 1973, 316, 317-335 (T3)

#### INTRODUCTION

Au cours de la chromatographie d'adsorption, les composés sont liés à d'adsorbant solide par des forces polaires et ioniques, et, plus faiblement par des forces non polaires ou de VAN DER WAALS. La séparation des mélanges lipidiques dépend de la polarité relative de chaque lipide : cette polarité est déterminée par le nombre et le type de groupements polaires de la molécule, et également par le nombre et le type de groupements non polaires ou hydrophobes. L'élution de la colonne par des solvants de polarité croissante permet la séparation du mélange lipidique en classes dont la polarité augmente également (MARINETTI, 1967 (T17)).

Il convient de noter que la séparation complète des lipides en classe n'est en général pas obtenue en une seule chromatographie en raison des chevauchements de polarité. Un fractionnement ultérieur sur couche mince ou sur un autre type de colonne est souvent nécessaire pour isoler à l'état pur, les diverses classes de lipides.

# MATERIEL ET METHODES

1 - Préparation du gel de silice selon ROUSER et coll. (1967, T18) : L'acide silicique (MALLINCKRODT) 100 mesh est utilisé après lavage selon la technique de ROUSER et coll. (1967, T18).

L'acide silicique est mis en suspension dans le méthanol (1 kg/3 l de  $CH_3OH$ ). Après un contact de 30 minutes, les particules les plus fines sont éliminées par aspiration. Ce lavage est répété 3 fois. Finalement le solvant est laissé à évaporer à la température du laboratoire. L'acide silicique est ensuite activé une nuit à 120°C avant l'emploi.

## 2 - Matériel :

Le chloroforme et le méthanol RP sont distillés avant l'emploi. Nous avons utilisé une colonne en verre de 60 cm de haut et de 1,5 à 2 cm de diamètre, munie d'un robinet en téflon, d'un rodage femelle afin de recevoir la tête d'adduction d'azote.

#### 3 - Montage de la colonne :

10 ou 20 g d'acide silicique activé à  $120^{\circ}$ C sont remis en suspension dans 50-100 ml de CHCl<sub>3</sub>, et équilibrés 30 mn à la température du laboratoire. Le mélange acide silicique/CHCl<sub>3</sub> est dégazé sous vide puis transvasé dans la colonne munie d'un bouchon de laine de verre et remplie de CHCl<sub>3</sub>/CH<sub>3</sub>OH, 2/1 (v/v).

La hauteur de gel dans la colonne est de 12 à 16 cm. La colonne est ensuite équilibrée en chloroforme par passage de 200 ml de ce solvant.

# 4 - Dépôt de l'échantillon :

Quand le solvant est à 2 mm au-dessus du niveau de l'acide silicique, l'échantillon lipidique repris dans 5 ml de CHCl<sub>3</sub> est déposé au sommet de la colonne à l'aide d'une pipette pasteur. Après pénétration du dépôt dans la colonne, les solutions de rinçage sont également déposées avec précaution au sommet de la colonne.

#### 5 - Elutions : purification des GSL (KARLSSON, 1973 (T3)) :

Les GSL obtenus après hydrolyse alcaline douce sont purifiés par chromatographie sur colonne d'acide silicique équilibrée en CHCl<sub>3</sub>. La charge est de 100 mg de lipides/gramme d'acide silicique et le volume éluant de 10 ml de solvant par gramme d'acide silicique. La vitesse d'élution de 3 ml/mn. L'élution est obtenue par passage successif de :

- CHCl<sub>3</sub>, (soit 200 ml);
- $CHCl_3 CH_3OH$ , 1/3 (v/v), (200 ml);
- CH<sub>3</sub>OH (200 ml).

Trois fractions A, B et C sont obtenues respectivement. La première fraction A contient les acides gras, le cholestérol et quelques pigments.

ANALYSE PAR CHROMATOGRAPHIE EN COUCHE MINCE DES FRACTIONS FA, B ET C SEPAREES SUR COLONNE D'ACIDE SILICIQUE



Plaque de gel de silice G activée 1 heure à 120°C solvant :  $CHCl_3-CH_3OH-H_2O$  (65 : 25 : 4, v/v/v) migration : 13 cm révélation : réactif à la Rhodamine 6G

FA : fraction A

L" : lécithine hydrolysée partiellement par le réactif alcalin (fiche n° 3

PI" : phosphatidyl-inositol hydrolysé partiellement

PE<sup>\*</sup> : phosphatidyl-éthanolamine hydrolysée partiellement

FB : fraction B

FC : fraction C

2119

ANALYSE PAR CHROMATOGRAPHIE EN COUCHE MINCE DES FRACTIONS F1, F2, F3, F4 ET F5 SEPAREES SUR COLONNE D'ACIDE SILICIQUE



Plaque de gel de silice G activée 1 heure à 120°C solvant :  $CHCl_3 - CH_3OH - H_2O$  (65 : 25 : 4, v/v/v) migration : 13 cm révélation : réactif à la Rhodamine 6G réactif à l'a-naphtol

BUS

Les GSL sont élués successivement au niveau des fractions B et C. Le schéma de l'élution des GSL est présenté figure *T1* ainsi que les résultats de l'analyse par chromatographie sur couche mince des fractions.

6 - Fractionnement des GSL neutres selon KARLSSON, 1973 (T3) :

Les GSL neutres totaux sont fractionnés par chromatographie d'adsorption sur colonne d'acide silicique équilibrée en CHCl<sub>3</sub> selon les conditions suivantes :

- charge de la colonne : 10 à 25 mg de lipides par gramme d'acide silicique ;

- volume éluant de chaque fraction : 20 ml/g d'acide silicique ;

- vitesse d'élution : 2 ml/mn.

L'élution est réalisée en augmentant la polarité du mélange éluant par des quantités croissantes de CH<sub>2</sub>OH.

Cinq fractions sont ainsi recueillies :

	la	fraction	F1	éluée	$\operatorname{par}$	le	mélange	CHC13/	CH 30H	dans	les	proportions	:	98/2 v/v
-	la	fraction	F2	11		11		"	ў н		1	ĩ	:	92/8 v/v
	la	fraction	F3	. 11		11		11	11		1	٢	:	85/15 <b>v/</b> v
	la	fraction	F4	*1		11		11	11		1	1	:	45/55 v/v
-	la	fraction	F5	11		**		11	11		t	t	:	Q/100.v/v

Le schéma d'élution est présenté figure T2 ainsi que l'étude en chromatographie sur couche mince des 5 fractions. Elles correspondent : fraction 1 (F1) principalement aux céramides et monoglycosylcéramides ; fraction 2 (F2) au mono et diglycosylcéramides ; fraction 3 (F3) en majeure partie aux di et tri-glycosylcéramides ; fraction 4 (F4) en majeure partie aux tétraglycosylcéramides ; fraction 5 (F5) à des lipides très polaires non identifiés.

# ANALYSE PAR CHROMATOGRAPHIE EN COUCHE MINCE DES FRACTIONS D ET E SEPAREES SUR COLONNE DE DEAE-CELLULOSE



Plaque de gel de silice G activée 1 heure à  $120^{\circ}$ C solvant : CHCl<sub>3</sub> - CH<sub>3</sub>OH-H<sub>2</sub>O (65 : 25 : 4,  $\nu/\nu/\nu$ ) migration : 13 cm révélation : réactif à la Rhodamine 6G



# FICHE 5 : CHROMATOGRAPHIE D'ECHANGE IONIQUE SUR COLONNE DE DEAE CELLULOSE

K.A. KARLSSON et coll., Biochim. Biophys. Acta, 1973, <u>316</u>, 317-335 (T3) ROUSER et coll., 1967 (T18) Lipid chromatographic analysis, DEKKER inc NY vol. I, 99-162

#### INTRODUCTION

La séparation des lipides par chromatographie d'échange ionique est basée sur l'échange de groupements ioniques. Cependant, des différences de polarité dûes à des groupements non ionisés comme les groupes hydroxyls peuvent également intervenir.

Trois grands groupes de lipides sont généralement séparés :

- les lipides non ionisés : neutres ;

- les lipides zwitterioniques ;

- les lipides acides.

Chacun de ces trois groupes, peut être fractionné en fonction de la différence de polarité et/ou d'acidité.

Deux types de support pour la chromatographie d'échange ionique sont possibles : la DEAE cellulose (= diéthylaminoéthyl-cellulose) et la TEAE cellulose (= triéthylaminoéthyl-cellulose). La première est généralement utilisée pour la séparation des lipides en classes, tandis que la seconde permettra la séparation des lipides ne possédant que des groupements carboxyls comme seuls groupements ionisés (ex : les acides biliaires et les gangliosides).

#### MATERIEL ET METHODES

#### 1 - Préparation de la DEAE selon KARAN-ROBERT (1975, T19) :

La DEAE cellulose (DE 11 Whatman) de haute capacité d'échange est mise à gonfler dans l'eau distillée. Après deux lavages à l'eau distillée et élimination des particules trop fines, la DEAE cellulose est mise en contact avec de la soude 5 % pendant 30 mn (60 g DEAE - 300 ml de NaOH à 5 %), puis elle est lavée par passage d'eau distillée jusqu'à obtention de la neutralité. La DEAE cellulose est ensuite convertie sous forme acétate par un contact de 30 minutes avec  $H_3$ C-COOH à 10 %. L'excès d'acide est éliminé par lavage à l'eau distillée et au méthanol. La DEAE cellulose est alors équilibrée dans le mélange solvant CHCl<sub>3</sub>-CH<sub>3</sub>OH dans les proportions 2/1 (v/v).

#### 2 - Montage de la colonne :

On utilise une colonne à chromatographie de 1,5 cm de diamètre et 60 cm de haut munie d'un robinet en téflon dans le bas, d'une tête rodée pour l'adduction de l'azote.

Le mélange de DEAE-cellulose et de  $CHCl_3/CH_3OH$  est versé dans la colonne jusqu'à l'obtention d'une colonne de 20 cm  $\pm$  3 cm de haut. Elle est équilibrée par passage de 200 ml de solvant  $CHCl_3-CH_3OH$  2/1.

# 3 - Dépôt de l'échantilion :

L'échantillon est repris dans 5 ml de solvant  $CHCl_3-CH_3OH 2/1 (v/v)$  et déposé à la partie supérieure de la colonne.

# 4 - Elution : purification des GSL neutres et acides (selon KARLSSON et coll., 1973 (T3) :

Les glycosphingolipides totaux purifiés sont soumis à un fractionnement par chromatographie d'échanges ioniques sur colonne de DEAE cellulose équilibrée en  $CHCl_3-CH_3OH$ , 2/1, v/v.

La charge est de 50 mg de lipides/gramme de DEAE cellulose.

L'élution est assurée par le passage successif de :

1 - CHCl<sub>3</sub>-CH<sub>3</sub>OH, 2/1 (v/v) à raison de 100 ml par gramme de cellulose ; 2 - CH<sub>3</sub>OH contenant 5 % de LiCl à raison de 25 ml par gramme de cellulose. Deux fractions D et E sont obtenues respectivement (figure T3), la première fraction D contient les GSL neutres. Les GSL acides sont élués au niveau de la fraction E. Afin d'éliminer le LiCl contenu dans le solvant, la fraction E est mise à dialyser 4 jours contre de l'eau distillée. Les GSL acides, contenus dans la phase inférieure après déphasage, sont recueillis et évaporés à sec sous vide et le résidu repris par le mélange CHCl<sub>3</sub>-CH<sub>3</sub>OH, 2/1, v/v. La chromatographie sur couche mince est le moyen le plus aisé pour séparer et identifier un mélange lipidique.

#### MATERIEL

- Gel de silice G (Merck) à raison de : 50 g gel/100 ml d'eau distillée

- Etaleur Desaga - plaque de verre 20 cm x 20 cm

- Epaisseur de la couche de gel : 250  $\mu$ 

- Application des échantillons à la seringue Hamilton sous courant d'azote afin d'éviter les dénaturations

- Dépôt : 20 à 80 µg de lipides

- Cuves de type Desaga (11 x 21 x 21 cm) et cuves sandwich de type Desaga.

# SYSTEME SOLVANT

De nombreux systèmes solvants ont été décrits pour assurer la séparation des diverses classes de lipides. Nous avons préféré le mélange suivant :

$$CHCl_3 - CH_2OH - H_2O$$
; 65-25-4 ( $\nu/\nu/\nu$ )

qui assure la séparation des GSL en fonction du nombre de résidus osidiques présents dans la molécule (ROUSER et coll., 1968 (T18) ; KARLSSON et coll., 1973 (T3)).

#### DETECTION

# 1 - Réactifs de détection générale :

a) <u>vapeurs d'iode</u>. Elles se fixent au niveau des doubles liaisons des acides gras. Les lipides non saturés apparaissent en brun sur fond jaune. b) <u>Rhodamine 6G.</u> Ce réactif est obtenu par dilution extemporanée de 1 volume d'une solution mère de Rhodamine à 50 mg/litre d'eau avec 1 'volume de NaOH 4N

Après pulvérisation et examen sous lumière ultraviolette des plaques encore humides :

- les phosphatides et lipides acides apparaissent en bleu ou pourpre ;
- les lipides neutres et phosphatides neutres en jaune-orange ;
- les produits de peroxydation en bleu gris ;
- les pigments de type chlorophylliens et caroténoides en bleu intense.

Lorsque les plaques sont sèches, les lipides apparaissent en jaune.

2 - Réactifs de détection des GSL :

 a) <u>Réactif de révélation des céramides (KARLSSON-PASCHER, 1971 (T20))</u>. Par pulvérisation des plaques avec une solution d'acétate cuprique à 3 % dans H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> à 8 % en milieu aqueux.

Après 25 minutes à 200°C, les composés de types céramides apparaissent en brun. Les composés insaturés apparaissent plus rapidement.

b) <u>Réactif à l'anaphtol révélateur des glycolipides (céramides-sulfolipides et gangliosides</u>). Les plaques sont pulvérisées avec une solution d'anaphtol à 0,5 % dans le mélange  $CH_{3}OH - H_{2}O(1/1 v/v)$  puis après séchage à l'air libre, avec un mélange acide sulfurique - eau  $(H_{2}SO_{4} - H_{2}O(95-5, v/v))$ .

La plaque est ensuite chauffée à 110°C jusqu'à apparition des glycolipides sous forme de taches pourpre -violacé sur fond blanc. Les lipides polaires apparaissent en jaune et le cholestérol en rose gris.

#### c) Réactif à la benzidine spécifique de la liaison amide des GSL.

- solution 1 :		
acide périodique	228	mg
eau distillée	10	ml

Cette solution est diluée au 1/20 dans l'acétone au moment de l'emploi.

- solution II :		
benzidine	184	mg
CH <sub>3</sub> COOH RP	0,4	ml
eau distillée	4,4	ml
acétone	45	mL

La solution I diluée au 1/20 est pulvérisée sur les plaques ainsi que la solution II 5 minutes après la première.

Les GSL apparaissent en blanc sur fond bleu.

d) Réactif à la ninhydrine spécifique des bases libres. Solution révélatrice de :

	N	inhydrine	0,20	g
dans	)	butanol	95	ml
	Ì	pyridine	5	ml

Après pulvérisation des plaques, les bases à longues chaînes libres apparaissent en rose. Cette coloration est instable.

3 - Réactif des phospholipides :

a) Réactif de Zinzadze.

- solution I :

Ebullition douce jusqu'à dissolution totale.

```
- solution II :
Poudre de Molybdène..... 1,78 g
Solution I..... 500 ml
```

15 minutes d'ébullition. Après élimination des résidus, mélanger 1 et II, volume à volume, puis ajouter 2 volumes d'eau.

Solution finale par mélange extemporané

5 ml	de solution I
5 ml	de solution II
20 ml	de CH <sub>3</sub> COOH RP
100 ml	d'eau distillée

Les phospholipides contenant le groupement choline apparaissent en orangé sur fond jaune pâle en quelques minutes.

## FICHE 7 : PURIFICATION DES GLYCOSPHINGOLIPIDES PAR CHROMATOGRAPHIE SUR COUCHE MINCE

Les GSL obtenus au niveau des fractions :

- FD = GSL neutres+ pigments
- F1 = Céramides + (MGCer)
- F2 = (MGCer) + DGCer
- F3 = DGCer + TGCer
- F4 = (TGCer) TRGCer
- F5 = TGCer TRGCer lipides polaires

nécessitent une étape supplémentaire de purification par chromatographie préparative sur couche mince en gel de silice afin d'obtenir chaque classe de GSL à l'état pur.

Les fractions correspondant aux divers GSL neutres et acides sont évaporées à sec, reprises dans 100  $\mu$ l - 200  $\mu$ l de CH<sub>3</sub>OH - CHCl<sub>3</sub> (1/2 v/v) puis déposées dans leur totalité sur des plaques de gel de silice activées 30 minutes à 120°C (voir fiche n° 6).

La migration et la séparation des GSL sont assurées par le solvant CHCl<sub>3</sub> - CH<sub>3</sub>OH - H<sub>2</sub>O (65-25-4 (v/v/v)). L'emplacement des taches est révélé par pulvérisation d'une solution de Rhodamine 6G et lecture des plaques en fluorescence afin de ne pas modifier la structure des acides gras contenus dans les divers GSL.

Après séchage des plaques, les taches correspondant aux divers GSL × (Cer - MGCer - DGCer, etc...) sont grattées et introduites dans de petites ampoules à décanter. Après addition de CHCl<sub>3</sub> (5 ml) et de CH<sub>3</sub>OH (5 ml) l'élution des GSL se fait par agitation vigoureuse pendant 10 minutes.

T15

# FRACTIONNEMENT DES GLYCOSPHINGOLIPIDES TOTAUX


L'addition de 4,5 ml d'eau distillée et l'agitation pendant une minute permettent le déphasage qui est total après 18 heures à + 4°C. La phase inférieure chloroformique contenant les GSL est recueillie et évaporée sous azote.

Le résidu sec repris par 1 ml de mélange solvant  $CHCl_3 - CH_3OH$ 2/1 (v/v) est gardé sous atmosphère d'azote à - 20°C en tubes scellés.

La pureté des fractions lipidiques est testée par chromatographie analytique en couche mince (fiche 5), d'une partie aliquote.

# FICHE 8 : COUPLAGE DES DIVERSES TECHNIQUES ET PROTOCOLE DE PURIFICATION DES GLYCOSPHINGOLIPIDES

K.A. KARLSSON et coll., Biochim. Biophys. Acta, 1973, 316, 317-335 (T3)

Afin d'obtenir chaque classe de glycosphingolipides, c'est à dire Cer, MGCer, DGCer, TGCer et TrGCer, nous avons suivi le protocole présenté tableau TIII.

Ce protocole préconisé par KARLSSON, 1973 (T3) correspond aux séquences suivantes :

- extraction des lipides totaux (fiche 1);
- hydrolyse des lipides totaux et obtention des GSL totaux (fiche 2) ;
- purification des GSL totaux par chromatographie d'adsorption sur colonne d'acide silicique (fiche 3) ;
- fractionnement des GSL totaux en GSL neutres et acides (fiche 4);
- fractionnement des GSL neutres en Cer, MGCer, DGCer, TGCer et TrCer (fiche 3);
- purification des Cer, MGCer, DGCer, TGCer et TrGCer par chromatographie préparative sur couche mince (fiche 6).

#### FICHE 9 : DOSAGE FLUORIMETRIQUE DES GLYCOSPHINGOLIPIDES

NAOI et coll. Analytical biochem., 1974, 58, 571-577 (T21)

#### INTRODUCTION

Les GSL forment une classe de lipides complexes caractérisés par la présence de N-acyl-sphingosine, liée soit à des hexoses (GSL neutres) ou à des hexoses sulfates (sulfatides) ou à des oligosaccharides contenant de l'acide sialique (gangliosides) ou enfin à la phosphocholine (sphingomyéline).

Seuls les dosages de la sphingosine et des bases homologues permettent d'évaluer la teneur en GSL d'un tissu. En effet, si les divers substituants de la base peuvent exister à des concentrations variables selon les GSL, une seule molécule de sphingosine par molécule de sphingolipide est présente chez tous les GSL connus.

Quatre types de méthodes ont été rapportés pour la détermination du taux de sphingosine.

La sphingosine libérée par hydrolyse acide des GSL (GAVER-SWEELEY, 1965 (T22)) sera ensuite dosée par chromatographie en phase gazeuse (WEISS, 1967 (T23)), après oxydation en aldéhydes libres (KARLSSON, 1970 (T24)) ou sous forme de diméthyl acétals ou enfin après triméthylsililation (CARTER-GAVER, 1967 (T25); GAVER-SWEELEY, 1965 (T22); KARLSSON, 1970 (T24)).

A ces techniques s'opposent les techniques colorimétriques où la sphingosine est complexée avec un colorant qui peut être :

- soit le méthyl-orange (CARTER-GAVER, 1967 (T25));
- soit la ninhydrine (LAUTER-TRAMS, 1962 (T26));
- soit le TNBS : acide trinitrobenzène sulfonique (SIAKOTOS, 1967 (T27) ; SIAKOTOS et coll., 1971 (T28)).

Trois techniques fluorimétriques ont été également décrites utilisant :

- le 1-naphtylamino-4-sulfonate (SIAKOTOS et coll., 1971 (T28));

- ou la fluorescamine (COLES-GRAY, 1970 (T29); KISIC-RAPPORT, 1974 (T30)).

Les critères de reproductibilité, sensibilité, spécificité et rapidité d'exécution nous ont guidés dans le choix d'une technique de dosage des GSL.

La technique utilisée est celle préconisée par NAOI (1974, T21) quand les GSL peuvent contenir des hexosamines ou céder des amines primaires hydrosolubles.

La sphingosine, libérée par hydrolyse acide des GSL est extraite du milieu aqueux par le diéthyl-éther, puis en présence de fluorescamine donne un complexe fluorescent, dont l'intensité de fluorescence est proportionnelle à la quantité de sphingosine libérée.

# MATERIEL ET METHODES

# 1 - Réactifs :

- agent d'hydrolyse HCl N en méthanol aqueux (CH<sub>2</sub>OH -  $H_2O$  : 82-18 v/v) ;

- NaOH 2N;
- tampon borate de sodium 0,2 M de pH 8,0 ;
- diéthyl-éther ;
- diéthyl-éther contenant 0,015 % de fluorescamine (Fluram des Laboratoires Roche).

2 - Méthode :

Les extraits de GSL (1-100 nanomoles) sont chauffés en tubes vissés à 70°C pendant 18 heures en présence de 0,5 ml d'HCl 1 M en méthanol aqueux.

Après refroidissement sur glace, l'hydrolyse est arrêtée par addition de 0,25 ml de NaOH 2N et 0,75 ml de tampon borate 0,2 M de pH 8,0.

Puis, 1,5 ml de diéthyl-éther sont ajoutés ainsi que 0,5 ml de diéthyl-éther contenant 0,015 % de fluorescamine.

T19



# COURBE D'ÉTALONNAGE DES DOSAGES FLUORIMETRIQUES



# FIGURE T5





Après agitation vigoureuse sur Vortex et déphasage, la phase éthérée supérieure est prélevée. L'intensité de la fluorescence est appréciée sur spectrofluorimètre Zeiss pour une longueur d'onde d'excitation de 385 nm et une longueur d'onde d'émission de 480 nm.

Les spectres d'émission et d'excitation, ainsi que la linéarité de la courbe étalon ont été vérifiés et sont présentés respectivement figure T4 et figure T5.

Les résultats sont exprimés en nanomoles de GSL/g de tissu lyophilisé. Quatre dosages ont été réalisés pour chaque type de tissus en fonction du génotype, du mode et du temps de pollinisation.

#### FICHE 10 : HYDROLYSE ACIDE DES GLYCOSPHINGOLIPIDES

# R.G. GAVER et C.C. SWEELEY J. Amer. oil Chem. Soc., 1965, 42, 294-298 (T22)

#### INTRODUCTION

La libération des acides gras constitutifs des lipides dépend de la structure de ces lipides.

Les lipides ne contenant que des O-acyl-esters, pas de plasmalogènes ni d'esters de cholestérol, sont facilement détruits soit par hydrolyse acide ou alcaline, soit par méthanolyse directe.

Les lipides contenant des liaisons de type : acides gras-groupements amides, tels que les sphingolipides, les lipopolysaccharides et les N-acylaminoacides, nécessitent des conditions d'hydrolyse plus drastiques que les O-acyl-esters. Deux modes d'hydrolyse (alcaline et acide) seront proposés.

L'hydrolyse alcaline préconisée par KARLSSON (1968, T32; 1969, T10; 1973, T3-T31) est moins utilisée (MORNSON, 1969, T12) que l'hydrolyse acide (BARTSCH, 1970, T6; COLES-FOOTE, 1974, T33; GAVER-SWEELEY, 1965, T22; HARWOOD-JAMES, 1975, T9; HIGASHI-HORI, 1968, T13; NAOI et coll., 1974, T21; SUGITA et coll., 1974, T8 par exemple).

Quatre types de réactifs acides peuvent assurer la destruction des glycosphingolipides et libérer quantitativement les bases, oses et acides gras soit :

- un réactif anhydre obtenu en faisant barboter du HCl gazeux dans du méthanol anhydre ;
- un réactif HCl, 1N CH<sub>3</sub>OH aqueux obtenu par dilution d'HCl concentré (8,55 ml) dans du méthanol (qsp 100 ml);
- un réactif HCl, 1N CH<sub>3</sub>OH contenant 10 M d'H<sub>2</sub>O (GAVER-SWEELEY, 1965, T22) ;
- un réactif HCl, 2N CH<sub>3</sub>OH (SWEELEY-MOSCATELLI, 1959, T34).

SCHEMA DES EXTRACTIONS SELECTIVES POUR L'IDENTIFICATION DES CONSTITUANTS DES GLYCOSPHINGOLIPIDES.



BU

La présence d'eau dans le réactif d'hydrolyse augmente le rendement de cette hydrolyse.

Ainsi nous avons préféré la technique préconisée par GAVER et SWEELEY (1965, T22) car elle libère la totalité des bases et minimise la production d'artéfacts indésirables telles la formation de 3-0 méthylsphingosine et celle de la 5-0 méthyl  $\Delta_3$  sphingosine.

MATERIEL ET METHODES

1 - Réactif d'hydrolyse :

Solution d'acide chlorhydrique dans du méthanol aqueux, préparé comme suit :

-	HCl concentré	8,6	тĺ	
-	Eau distillée	9,4	ml	
	Méthanol	100	ml	qsp

Obtention d'une solution HCl 1M contenant 10 M d'eau.

# 2 - Protocole opératoire :

Deux mg de GSL sont repris par 1 ml du réactif d'hydrolyse.

L'hydrolyse se fait à 70°C pendant 18 à 23 heures sous atmosphère d'azote.

Au terme de l'hydrolyse, les échantillons sont refroidis jusqu'à la température ambiante, ce qui permettra après extractions sélectives (figure T6) les analyses ultérieures par chromatographie en phase gazeuse.

FIGURE T7

PROTOCOLE D'ANALYSE DES ACIDES GRAS CONSTITUTIFS DES GLYCOSPHINGOLIPIDES



BUS

# FICHE 11 : PREPARATION DES ESTERS METHYLIQUES D'ACIDES GRAS

#### INTRODUCTION

L'identification et la répartition des acides gras des différentes classes de lipides se font sous forme d'esters méthyliques par chromatographie gaz-liquide. La fixation d'un groupement méthyle sur la fonction acide des acides gras par une liaison ester, permet d'abaisser la température de vaporisation de ces composés et de diminuer les effets d'adsorption sur le support imprégné de phase stationnaire.

Des deux méthodes proposées qui conduisent à la préparation des esters méthyliques d'acides gras :

- l'une comprend une saponification suivie d'une méthylation ;

- l'autre, permet d'obtenir directement par transestérification, les esters méthyliques à partir des lipides. Nous avons retenu la seconde.

La transméthylation en effet plus rapide est réalisée en quelques minutes par action de la température sur les lipides en présence :

- de diazométhane en solution dans le mélange méthanol éther ;
- de méthanol-HCl gazeux (HOSHI et coll., 1973, T36; GREELEY, 1974, T36);
- de méthanol-trifluorure de Bore (BF 3) (METCALFE-SCHMIDT, 1961, T38; METCALFE et coll., 1966, T39; MORNSON-SMITH, 1964, T40);
- de méthoxyde de sodium (METCALFE et coll., 1966, T39) ;
- de méthanol-trichlorure de Bore (BCl<sub>3</sub>) (KLOPTENSTEIN, 1972, T37).

Cependant, afin d'éviter l'instabilité de ces réactifs et la production d'artéfacts (DAWIDOWICZ-THOMPSON, 1971, T41 ; JOHNSON et coll., 1976, T42 ; KISHIMOTO-RADIN, 1965, T43 ; LOUGH, 1964, T44), nous avons opté pour une transméthylation par le mélange méthanol-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> bien que cette dernière technique soit plus longue. SEPARATION ET PURIFICATION PAR CHROMATOGRAPHIE SUR COUCHE MINCE

DES ESTERS METHYLIQUES D'ACIDES GRAS



Plaque de gel de silice G activée 10 minutes à 110°C solvant : benzène migration : 13.cm révélation : Rhodamine 6G

8U; UL

#### **METHODES**

Les diverses étapes sont schématisées dans la figure T7.

# 1 - Extraction :

Après hydrolyse selon le protocole décrit (cf. fiche 9), les acides gras libérés ne sont que partiellement estérifiés. Ils sont donc extraits sélectivement par 3 fois 3 ml de n-hexane en vue de subir une transestérification.

#### 2 - Transestérification :

Les acides gras contenus dans le n-hexane sont évaporés à sec, et repris ensuite par 3 ml de méthanol additionnés de 10 gouttes d'acide sulfurique concentré. La transméthylation se déroule à 70°C pendant 2 heures.

Après refroidissement, les esters méthyliques d'acides gras sont transvasés dans une ampoule à décanter avec 3 ml d'heptane et 3 ml d'eau distillée. Après agitation et déphasage, la phase supérieure heptanoique est filtrée sur sulfate de sodium anhydre, puis évaporée. Les esters méthyliques sont repris par 50 µl de chloroforme en vue d'une purification sur gel de silice.

# 3 - Purification des esters méthyliques :

La transméthylation n'étant jamais complète, un faible pourcentage d'acides gras ne sont pas méthylés puisqu'il s'agit d'un équilibre, il est donc indispensable d'éliminer ces composants ainsi que les éventuels contaminants provenant des solvants utilisés. Pour ces raisons, il convient de purifier les esters méthyliques par chromatographie sur couche mince.

Les esters méthyliques en solution dans le chloroforme sont déposés sur des plaques de gel de silice G activées 10 minutes à 110°C.

Le solvant de migration est le benzène.

Après migration, les fractions sont révélées par pulvérisation d'une solution de Rhodamine 6G. Le spot correspondant aux esters méthyliques repéré grâce l'utilisation de témoins (figure T8) est gratté. Le gel de silice est déposé dans une petite colonne à chromatographie dont l'extrémité inférieure est garnie de laine de verre.

Après évaporation, les essers sont repris par le sulfure de carbone et analysés par chromatographie gaz-liquide.

# FICHE 12 : ETUDE DE LA COMPOSITION EN ACIDES GRAS PAR CHROMATOGRAPHIE GAZ-LIQUIDE

#### MATERIELS

La composition en acides gras des différentes fractions de GSL a été réalisée sur un appareil Varian 1800, équipé d'un détecteur à ionisation de flamme.

Deux types de colonnes peuvent être utilisées.

- Une colonne de type standard en acier inox, de 3 mètres de long et 3 mm de diamètre, remplie de diéthylène-glycol-succinate (DEGS) à 10 % en poids sur un support inerte (chromosorb W) de granulométrie 60/80 mesh AW. L'analyse s'effectue à 176°C, les températures de l'injecteur et du détecteur sont respectivement de 210°C et 220°C environ. Le débit du gaz vecteur (azote R) est de 25 ml/minute à la sortie de la colonne.

- Une colonne capillaire en acier inox de 50 mètres de long et 0,5 mm de diamètre, remplie de Carbo-wax 20 m. Les températures de l'injecteur et du détecteur sont respectivement de 250°C ; la colonne est stabilisée à 220°C. L'azote R est admis à la pression de 0,3 bar à l'entrée de la colonne. Ce type de colonne permet l'analyse de très faibles quantités d'esters méthyliques. Le pouvoir de résolution meilleur et le temps d'analyse réduit permettent l'analyse d'acides gras très longs tel que l'acide lignocérique (C24 : 0) et nervonique (C24 : 1).

#### IDENTIFICATION DES ACIDES GRAS

L'identification de tous les acides gras reste un problème difficile à résoudre : aucune méthode prise séparément ne permet d'identifier avec certitude tous les acides gras. L'utilisation simultanée des principales méthodes permet cependant d'identifier la plupart de ces acides gras.









BUS

## 1 - Comparaison des temps de rétention :

Cette méthode est classique et rapide. Il suffit de comparer les temps de rétention des pics inconnus, avec ceux obtenus pour les esters méthyliques d'acides gras témoins commerciaux.

Pour un type de colonne, le temps de rétention absolu évolue avec le temps. Le temps de rétention relatif, par rapport à l'acide stéarique (C18 : 0) est constant pour un type de phase stationnaire, de température et de débit d'azote.

# 2 - Comparaison des temps de rétention obtenus sur des phases de polarité différente :

Sur une phase polaire (DEGS), la présence d'une double liaison dans la molécule d'acide gras augmente l'adsorption sur la phase stationnaire d'où une élévation du temps de rétention par rapport à l'acide gras saturé de même longueur de chaîne. Cette augmentation est d'autant plus importante que le nombre de doubles liaisons est plus élevé et que la position de l'une d'elles est plus proche de l'extrémité méthyle de la chaîne.

Sur le carbo-wax 20 M, tous les acides gras d'une même série (saturées et insaturés) sortent avant les acides gras de la série suivante.

Sur les DEGS l'acide linolénique (18 : 3) et l'acide arachidique (20 : 0) ont des temps de rétention quasi-identique, alors qu'ils sont parfaitement séparés sur Carbo-wax 20-M.

L'utilisation simultanée des deux types de phase et la comparaison des temps de rétention relatifs permettent d'identifier les acides gras à 24 et 22 atomes de carbone saturés ou non.

# 3 - Relations entre les temps de rétention et le nombre d'atomes de carbone (figure T9) :

Il existe pour les acides gras homologues d'une même série une relation linéaire entre les logarithmes décimaux des temps de rétention et le nombre d'atomes de carbone des molécules.

Sur une feuille de papier semi-logarithmique nous portons en abcisse le nombre de carbone de la chaîne (échelle métrique) et en ordonnée le temps de rétention (échelle logarithmique). Ainsi, pour chaque série homologue d'acides gras, nous obtenons une droite et les droites tracées sont parallèles. Il est possible ainsi, à l'aide des temps de rétention de deux acides gras connus sur un chromatogramme et appartenant à la même série homologue, de tracer une droite et ensuite de déterminer les temps de rétention théorique des autres acides gras de la série et de les comparer à ceux des pics inconnus.

## 4 - Méthode utilisant les longueurs équivalentes de chaîne carbonée ECL :

Comme par la méthode précédente, on trace la droite joignant les points obtenus en portant en abcisse le nombre d'atomes de carbone des acides gras saturés et en ordonnée les logarithmes des temps de rétention. Puis en utilisant les temps de rétention des acides

-	oléique C18	1	ω	9
-	linoléique C18	2	Ŵ	6
~	Linolénique C18	3	ω	3

on détermine sur le graphique la longueur équivalente de chaîne carbonée pour les trois types de doubles liaisons W9, W6 et W3

- l'acide oléique possède 1 double liaison en W9

- l'acide linoléique possède 1 double liaison en W6 et une en W9

- l'acide linolénique possède 1 double liaison en W3, une en W6 et une en W9.

ACKMAN et coll. (1973, T45) supposent que, lorsqu'un acide gras contient plusieurs doubles liaisons, la valeur ECL de l'ensemble de celles-ci est égale à la somme des valeurs obtenues pour ces doubles liaisons prises individuellement. Ils admettent également que si un acide gras possède plus de 3 doubles liaisons, les autres situées entre la liaison en W et l'extrémité carbonyle sont affectées de la valeur ECL de la double liaison W9.

Pour le calcul, on porte le temps de rétention de l'acide cléique en ordonnée et on obtient en abcisse sa longueur équivalente de chaîne. Par différence avec celle de l'acide saturé correspondant (stéarique) on en déduit la valeur ECL de la double liaison W9. Connaissant cette valeur, et en opérant de la même façon, on déduit la valeur de la double liaison en W6 puis en W3.

Si on veut déterminer la nature d'un pic inconnu, on détermine son temps de rétention et au moyen de la droite précédente, on obtient sa longueur équivalente de chaîne carbonée. Puis par différence avec l'acide gras saturé précédent sur le chromatogramme, on déduit l'incrément dû à la somme de ses doubles liaisons. L'incrément est composé à l'aide des valeurs ECL des liaisons W3, W6 et W9. Des hypothèses sur le nombre et la position des doubles liaisons sont formulées. Selon les résultats obtenus par d'autres méthodes d'identification, il convient de choisir l'hypothèse la plus probable.

# 5 - Hydrogénation :

La comparaison des chromatogrammes avant et après hydrogénation permet de préciser la longueur de chaîne des acides gras et notamment celle des acides gras insaturés.

## EVALUATION DU POURCENTAGE DE CHAQUE ACIDE GRAS

Cette évaluation peut être effectuée par l'une des trois méthodes suivantes. Les paramètres servant à cette évaluation sont définis figure 10.

1 - Triangulation :

Les courbes de GAUSS sont assimilées à des triangles en utilisant les tangentes au point d'inflexion (Triangle ADF et ILN), la surface du pic est exprimée par la formule :

# 2 - Mesure de la largeur du pic à mi-hauteur et en multipliant par la hauteur :

Les hauteurs des pics (BE - JM) sont mesurées et les valeurs 0,5.h (EH et MP) sont marquées perpendiculairement au sommet de chaque pic. La largeur à la mihauteur (CG - KQ) est mesurée en millimètre.

#### surface du pic = $BE \times CG$

Cette méthode, théoriquement précise, est inemployable pour les pics rapides dont les largeurs sont très faibles.

3 - Par le produit temps de rétention absolu que multiplie la hauteur du pic :

Cette méthode dépend du fait que la largeur du pic est une fonction linéaire du temps de rétention.

La détermination des surfaces des différents pics se fait par la mesure des hauteurs de pic (BE - JM) en millimètre et par la mesure des temps de rétention (OE - OM) en millimètre également.

surface du pic = BE x OM

Cette méthode est rapide et précise.

Les proportions relatives des différents acides gras sont exprimées en calculant le pourcentage des surfaces de chaque pic par rapport à la surface totale des pics retenus. Les résultats sont exprimés en pourcentage d'esters méthyliques.

Aucune méthode de mesure n'est parfaite, et l'évaluation des pics très aplatis est entachée d'erreurs importantes.

Les compositions en acides gras présentées ont été réalisées sur colonne de DEGS. Chaque analyse est le résultat moyen de trois injections. L'identification des acides gras a été réalisée en comparant les temps de rétention, en utilisant les relations entre temps de rétention et longueur de chaîne et parfois les ECL. L'évaluation des pourcentages est réalisée par la multiplication du temps de rétention par la hauteur du pic. PROTOCOLE D'ANALYSE DES BASES A LONGUES CHAINES CONSTITUTIVES DES GLYCOSPHINGOLIPIDES





# FICHE 13 : ETUDE DE LA COMPOSITION EN BASES A LONGUE CHAINE (LCB) DES GLYCOSPHINGOLIPIDES

#### INTRODUCTION

La présence de bases à longue chaîne dans les hydrolysats acides de GSL a été démontrée par CARTER. Et, par la suite, les travaux de CARTER et de KARLSSON ont conduit à la classification de ces composés. L'analyse de ces bases impose l'identification des bases par :

- l'évaluation de la longueur de la chaîne carbonée ;
- la mise en évidence de l'existence de doubles liaisons ;
- la détermination de la position des branchements.

Ces bases peuvent être identifiées par des analyses en chromatographie sur couche mince dans divers solvants et par chromatographie en phase gazeuse (WEISS, 1967, T23).

L'instabilité de ces bases, au cours de l'hydrolyse et après, nous a conduit à retenir le protocole expérimental suivant et schématiquement illustrée par la figure *T11*.

1 - libération des bases selon GAVER (1965, fiche 9);

- 2 transformation en DNP-Dérivés qui stabilisent les bases, puis études chromatographiques de ces DNP-Dérivés en couche mince et purification ;
- 3 oxydation par le tétraacétate de plomb des DNP-Dérivés en aldéhydes puis analyses chromatographiques en couche mince et en phase gazeuse ;
- 4 oxydation par le permanganate de potassium des aldéhydes en acides gras, et analyses chromatographiques en phase gazeuse.

#### LIBERATION DES BASES A LONGUE CHAINE SELON GAVER

Pour les raisons précédemment décrites (fiche 9), nous avons choisi les conditions d'hydrolyse qui assurent la libération de la totalité des bases et qui produisent le minimum d'artéfacts. SEPARATION PAR CHROMATOGRAPHIE SUR COUCHE MINCE DES DERIVES DINITROPHENYLES DES BASES A LONGUES CHAINES



Plaque de gel de silice G contenant 2 % de borate de Sodium activée 30 mn à 120° migration: 13 cm solvant : chloroforme-n-hexane-méthanol (50/50/20, v/v/v)

Α	12	erythrosphinganine (d18 : 0)
В	:	sphingosine (d18 : 1)
С	:	phytosphingosine (t18 : 0)
D	:	impuretés
Ε	:	mélange de bases (d18 : 0,1 et t18 : 0)
$\mathbf{F}$	:	mélange non purifié de bases

BUS

Après une hydrolyse acide afin de respecter la configuration des bases, les GSL sont coupés en :

- esters d'acides gras ;

- bases à longue chaîne (LCB) ;

- sucres.

Les acides gras sont extraits dans un premier temps par le n-hexane (3 fois 3 ml) puis analysés en CPG. La phase méthanolique inférieure contient les sucres et les bases (LCB).

Les ICB sont extraites sélectivement par 4 volumes de diéthyl-éther après alcalinisation du milieu jusqu'à pH 11, par addition de soude 1N.

Les LCB contenues dans le diéthyl-éther sont évaporées à sec en vue de la dinitrophénylation.

#### ANALYSES DES BASES SOUS FORME DE DNP-DERIVES

1 – Obtention des DNP-Dérivés des bases (KARLSSON, 1970, T24; KARLSSON et coll., 1968, T46) :

Les LCB (5 mg) sont reprises par 1 ml de méthanol contenant 5 µl de 1 fluoro-2.4-dinitrobenzène. Après addition goutte à goutte de 4 ml de tampon borate de K de pH 10,5, la dinitrophénylation se poursuit à 60°C pendant 30 minutes. Le déphasage est assuré par addition de CHCl<sub>3</sub>, CH<sub>3</sub>OH et H<sub>2</sub>O jusqu'à obtention de concentrations finales en CHCl<sub>3</sub>-CH<sub>3</sub>OH-H<sub>2</sub>O, 8-4-3 (v/v/v). Les LCB-DNP dérivés contenus dans la phase inférieure sont récupérés en vue d'une purification et d'une identification par chromatographie sur couche mince.

> 2 - Purification des DNP-Dérivés des bases (KARLSSON, 1970, T24 ; KARLSSON et coll., 1968, T46) :

La dinitrophénylation procure des avantages certains comme la perte minimale des composants causée par dégradation, réarrangement et condensation des bases après le clivage de la liaison amide. Cependant, les DNP-Dérivés des bases doivent être purifiées par chromatographie sur acide silicique afin d'éliminer les impuretés et les excès de réactifs et de séparer les bases des bases 5-hydroxylées. Un essai de purification des bases témoins par chromatographie sur colonne d'acide silicique nous a permis de tester la méthode. Pour cela, les tubes à chromatographie sont remplis avec 2 g d'acide silicique équilibré dans le mélange solvant diéthyl éther - hexane 3/7 (v/v).

La séparation chromatographique est assurée par le passage successif des solvants suivants :

	diéthyl	éther/hexane	3/7	(v/v)	1	р
-	diéthyl	éther/hexane .	3/3	(v/v)	2	р
-	diéthyl	éther/hexane	3/1	(v/v)	3	р

à raison d'un volume éluant de 20 ml/gramme d'acide silicique.

- la fraction 1 correspond aux impuretés (excès de réactifs, etc...) ;

- la fraction 2 contient les DNP-Dérivés des bases ;

- la fraction 3 contient les 5-hydroxy DNP-Dérivés des bases.

Mais les très faibles concentrations en bases présentées par notre matériel, ne nous a pas permis d'appliquer cette méthode de purification par chromatographie sur acide silicique, ainsi testée pour des bases témoins. Nous avons donc utilisé la chromatographie en couche mince pour analyser et purifier les DNP-Dérivés.

## 3 - Analyse et purification par chromatographie en couche mince des DNP-Dérivés des bases (KARLSSON-MARTENSON, 1968, T46) :

L'identification des DNP-Dérivés des bases peut se faire par chromatographie en couche mince.

Les DNP-Dérivés peuvent être séparés en di-hydroxy-dérivés saturés ou insaturés et en tri-hydroxy-dérivés, par chromatographie en couche mince sur gel de silice G contenant 2 % de borate de Na et activé 30 minutes à 120°C.

La migration est assurée par le mélange solvant chloroforme-n hexane-méthanol dans les proportions 50-50-20 (v/v/v), la dinitrophénylation colorant les LCB en jaune, aucune révélation n'est nécessaire. Les bases hydroxylées saturées migrent le plus loin, suivie par les bases di-hydroxylées insaturées, puis par les bases tri-hydroxylées (figure *T12*).

Après grattage des taches individuelles, les DNP-Dérivés des bases ainsi purifiées, sont élués quantitativement par le méthanol.

T32

#### FIGURE T13

# SEPARATION PAR CHROMATOGRAPHIE EN COUCHE MINCE DES ALDEHYDES DERIVANT DES BASES A LONGUES CHAINES

Plaque de gel de silice G activée 1 heure à 120°C. solvant : n-hexane - diéthyléther - acide acétique (90 : 10 : 1, v/v/v) migration : 13 cm révélation : 2-4 dinitrophénylhydrazine à 0,4 % dans HCl 2N'

aldéhyde en C16 : 1 correspond à la sphingosine (d18 : 1) Α : aldéhyde en C15 : O correspond à la phytosphingosine (t18 : 0) В :. aldéhyde en C16 : O(a) correspond à l'étythrosphinganine (d18 : O) С : aldéhyde en C16 : O(b) correspond à la thréosphinganine (d18 : O) С : Ε mélange d'aldéhydes : C16 : 0,1 et C15 : 0 : F mélange d'aldéhydes provenant des glycosphingolipides :



# ANALYSES DES BASES DINITROPHENYLEES SOUS FORME D'ALDEHYDES

## 1 - Oxydation des DNP-Dérivés en aldéhydes par le tétra-acétate de plomb (SUGITA et coll., 1976, T47) :

- <u>Généralités</u>. Les estimations microanalytiques de la sphingosine et des composés homologues reposent sur :

a) l'oxydation des bases purifiées, en aldéhydes et l'analyse de ces aldéhydes homologues par chromatographie en phase gazeuse. Plusieurs réactifs ont été proposés :

- l'acide périodique en milieu alcoolique (SWEELEY et coll., 1969, T48);

- le tétra-acétate de plomb (KARLSSON-STEEN, 1968, T32 et SUGITA et coll., 1976, T47).

b) l'oxydation des aldéhydes en acides gras homologues et analyse des acides gras par chromatographie en phase gazeuse. L'oxydation est alors réalisée par le permanganate (WEISS, 1967, T23).

c) la réduction des aldéhydes en alcools homologues et analyse par chromatographie en phase gazeuse.

Nous avons choisi d'oxyder les DNP-Dérivés des bases par le tétra-acétate de Pb et d'analyser les aldéhydes homologues formés.

Au cours de l'oxydation par le tétra-acétate de plomb, les bases tri-hydroxylées perdent trois atomes de carbone, tandis que les bases di-hydroxylées n'en perdent que deux. Ainsi :

- la phytosphingosine (t18 : 0) donne naissance à un penta-décanal saturé en C15 : 0);
- la sphinganine (d18 : 0), à un hexadécanal saturé en C16 : 0 ;
  et la sphingosine (d18 : 1) à un hexadécanal en C16 : 1.

De plus, une base di-hydroxylée (par exemple d18 : 0) et une base tri-hydroxylée possédant un atome de carbone supplémentaire (t19 : 0), conduisent après oxydation par le tétra-acétate de plomb, au même aldéhyde (dans ce cas à un héxadécanal C16 : 0). IDENTIFICATION PAR CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE DES ALDEHYDES DERIVES DES BASES A LONGUES CHAINES : DIAGRAMME TEMOIN



BUS

- <u>Mode opératoire</u>. 2 mg de bases sous forme de DNP-Dérivés sont repris par 0,1 ml de benzène contenant 30 mg de tétra-acétate de plomb. L'oxydation se déroule à 50°C pendant 1 heure.

Après refroidissement, 5 ml d'eau distillée sont ajoutés au milieu réactionnel, ainsi que 5 ml de n-hexane. Après agitation et déphasage, les aldéhydes à longue chaîne, solubles dans le n-hexane sont recueillis et analysés par chromatographie en couche mince et en phase gazeuse.

# 2 - Analyse des aldéhydes par chromatographie sur couche mince G. VAN DESSEL (1977, T49) :

La séparation chromatographique sur couche mince des aldéhydes à longue chaîne dérivants des bases dinitrophénylées, est réalisée sur plaque de gel de silice G (fiche n° 5), dans le système solvant : n-hexane / diéthyléther / acide acétique dans les proportions : 90/10/1 (v/v/v).

Les aldéhydes libres, ainsi que les cétones et les plasmalogènes apparaîssent en jaune après pulvérisation des plaques avec le réactif à la 2-4 dinitrophényl-hydrazine, et léger chauffage à 120°C.

La séparation des aldéhydes se fait en fonction de la longueur de chaîne et du degré de saturation (figure T13).

#### - Mode opératoire.

. plaques de gel de silice G (fiche 5) activées une heure à 120°C ;

. solvant : n-hexane/diéthyléther/acide acétique, 90/10/1 (v/v/v) ;

. réactif de révélation : solution de 2-4 dinitrophényl-hydrazine à 0,4 % dans HCl 2N ;

. distance de migration : 13 cm.

# 3 - Analyse des aldéhydes à longue chaîne par chromatographie en phase gazeuse :

Les aldéhydes à longue chaîne peuvent être séparés par chromatographie en phase gazeuse sans conversion préalable en un autre dérivé, en utilisant divers types de phase tels que par exemple :

- SE 30 à 3 % sur chromosorb W-AW DMCS

- DEGS à 15 % sur chromosorb W-H MDS 80-100 mesh

- ECSSX à 5 % sur Gas chromosorb Q 80-100 mesh.

a) <u>Conditions opératoires</u>. L'analyse par chromatographie en phase gazeuse a été réalisée sur un appareil Varian muni d'un détecteur à ionisation de flamme. La séparation chromatographique est effectuée sur une colonne standard en inox, remplie de diéthylène-glycol-succinate (DEGS) à 10 % en poids sur un support inerte de chromosorb-W de granulométrie 60/80 mesh AW.

La température de la colonne est de 150°C, celle de l'injecteur de 170°C et celle du détecteur de 190°C.

Le débit du gaz vecteur (azote R) était de 19-20 ml/mn en tête de colonne.

b) <u>Identification des aldéhydes à longue chaîne</u>. L'identification des aldéhydes à longue chaîne, comme celle des acides gras est un problème difficile à résoudre.

- la comparaison des temps de rétention des pics inconnus avec ceux obtenus en utilisant des aldéhydes commerciaux est parfois impossible. En effet, les aldéhydes témoins ne sont pas tous commercialisés, et il faut les synthétiser à partir, par exemple, des acides gras homologues.

Nous avons utilisé comme témoins, les aldéhydes à longue chaîne provenent de l'oxydation par le tétra-acétate de plomb des bases à longue chaîne du commerce.

le pentadécanal C15 : 0 provient de la phytosphingosine t18 : 0 ;
le pentadécanal C15 : 1 provient de la déhydrophytosphingosine t18 : 1 ;
l'héxadécanal C16 : 0 provient de la sphinganine d18 : 0 ;
l'héxadécanal C16 : 1 provient de la sphingosine d18 : 1.

- il existe également, pour les aldéhydes à longue chaîne, une relation linéaire entre les logarithmes décimaux des temps de rétention, et le nombre d'atomes de carbone contenus dans la molécule. Cette relation est analogue à celle qui existe pour les acides gras homologues (fiche n° 11). Cependant la longueur de chaîne équivalente à une double liaison est difficile à définir.

De plus, contrairement au comportement des acides gras sur le même support, les composés en C15 (saturés ou non) ne précèdent pas les composés en C16 (saturés ou non). Le pentadécanal est caractérisé par un temps de rétention intermédiaire entre celui de héxadécanal et celui de l'héptadécanal comme l'illustre la figure T14 représentant un chromatogramme témoin.

Cette difficulté rend nécessaire la confirmation de ces identifications par l'emploi d'une autre technique. c) <u>Evaluation du pourcentage de chaque aldéhyde</u>. Cette évaluation peut être effectuée comme pour les acides gras :

- soit par triangulation ;

- soit par le produit de la largeur du pic à mi-hauteur, par la hauteur du pic ;

- soit finalement par le produit du temps de rétention absolu par la hauteur du pic.

C'est cette troisième méthode que nous avons appliquée.

d) <u>Conclusions</u>. L'identification des bases sous forme d'aldéhydes présente un grand désavantage dû à l'instabilité particulière des aldéhydes.

En effet, les aldéhydes et plus particulièrement les aldéhydes à chaîne courte, se condensent et se polymérisent en dimères et trimères qui sont relativement non volatils. Cette polymérisation est accélérée en milieu alcalin.

La transformation des bases à longue chaîne en aldéhydes homologues et l'analyse des aldéhydes par chromatographie en phase gazeuse doivent être réalisées très rapidement afin d'éviter cette polymérisation.

Le deuxième problème concerne l'identification des aldéhydes dont la chaîne carbonée est désaturée. Cette identification ne peut être réalisée que par l'emploi simultané de plusieurs techniques. Les aldéhydes vont donc être transformés en produits volatiles stables :

- soit sous forme de diméthyl-acétal

 $RCHO + 2CH_{3}OH \longrightarrow R - C \swarrow O-CH_{3} + H_{2}O$   $(H^{+}) \qquad H \qquad H \qquad O-CH_{3} + H_{2}O$ 

- soit sous forme d'alcool - soit sous forme d'acidesgras

identifiables par chromatographie en phase gazeuse.

Pour des raisons techniques (identité de colonne) nous avons opté pour la transformation des aldéhydes à longue chaîne en acides gras homologues.

#### ANALYSE DES BASES SOUS FORME D'ACIDES GRAS

Le passage des aldéhydes provenant des bases à longue chaîne constitutives des GSL, en acides gras homologues se fait par oxydation au permanganate de potassium.

Cette oxydation peut avoir lieu : - soit directement sur le mélange d'aldéhydes ; - soit après hydrogénation catalytique.

Au cours de cette oxydation, les aldéhydes désaturés sont en général partiellement détruits.

Si l'oxydation a lieu directement sur le mélange, l'analyse par chromatographie en phase gazeuse permet de confirmer l'identité des aldéhydes, mais seuls les aldéhydes saturés peuvent être dosés.

Après hydrogénation catalytique et oxydation, l'identification repose sur l'étude de la disparition des pics correspondants aux aldéhydes désaturés et par le dosage des aldéhydes saturés.

Nous avons oxydé directement les aldéhydes à longue chaîne afin de confirmer la nature des bases constitutives des GSL.

1 - Oxydation des aldéhydes en acides gras (SLOMIANY-HOROWITZ, 1970, T50) :

a) <u>Réactifs</u>.

solution saturée de KMNO<sub>4</sub>;
solution saturée de NaHSO<sub>3</sub>;
soude 0,2 N;
H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> RP.

b) <u>Mode opératoire</u>. Les aldéhydes sont séchés sous un courant d'azote à 30°C. Ils sont ensuite remis en suspension dans 0,3 ml de NaOH 0,2 N.

Après addition de la solution de  $\text{KMNO}_{l_4}$  jusqu'à persistance de la coloration ( 0,3 ml) et agitation vigoureuse pendant 5 minutes, le milieu réactionnel est acidifié par addition de 0,1 ml  $\ddot{a}'H_2SO_{l_4}$  RP. La solution est ensuite décolorée par addition progressive de NaHSO<sub>3</sub> (0,3 - 0,4 ml).

Après filtration si nécessaire, sur filtre Whatman n° 1, les acides gras sont extraits par le diéthyl-éther (3 x 1,5 à 2 ml).

Les acides gras contenus dans le diéthyl-éther sont évaporés à sec et analysés par chromatographie en phase gazeuse.

2 - Analyse des acides gras :

Cette étape nécessite préalablement :

- une étape de transestérification (fiche n° 10);

- une étape de purification des esters méthyliques d'acides gras (fiche n° 10) par chromatographie sur couche mince ;

- une injection sur colonne de DEGS à 10 % en poids sur support de chromosorb (fiche n° 11).

Les résultats de cette étape confirment les résultats obtenus avec les aldéhydes.

# FIGURE T15

PROTOCOLE D'IDENTIFICATION DE LA COPULE GLUCIDIQUE DES GLYCOSPHINGOLIPIDES





# IDENTIFICATION PAR CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE DES OSES



A - Chromatogramme témoin des pentoses





FICHE 14 : ETUDE DE LA COMPOSITION EN OSES DES GLYCOSPHINGOLIPIDES B. FOURNET et coll. - Biochimie, 1975, 57, 161-165 (T51)

L'analyse de la copule glucidique des glycosphingolipides a été réalisée dans le laboratoire de Monsieur FOURNET que nous remercions vivement.

Cette analyse nécessite trois étapes :

- méthanolyse ;

- trifluoroacétylation ;

- étude par chromatographie en phase gazeuse.

# 1 - Hydrolyse des GSL :

Après hydrolyse des GSL et extraction des acides gras, la phase inférieure méthanolique est neutralisée par addition d'acétate d'argent (100 mg) et les oses extraits par le méthanol.

2 - Méthanolyse : FOURNET (1975, T51) :

Comme l'indique le schéma T15, les oses libres provenant de l'hydrolyse des GSL purifiés, et certains GSL natifs purifiés vont être soumis à une étape de méthanolyse.

250 µg de carbohydrate et 50 µg de méso-inositol jouant le rôle de témoin interne, sont introduits dans un tube en pyrex (Sovirel 92 Levallois Perret France) puis sont lyophilisés et desséchés toute une nuit dans un dessicateur sur  $P_2O_3$ .

Le résidu est repris par 2 ml d'HCl 0,5 M en solution dans du méthanol anhydre. Les tubes sont scellés et laissés 24 heures à 80°C.

Le méthanolysat est ensuite refroidi et séché sous courant d'azote à 50°C.
## 3 - Trifluoroacétylation : FOURNET 1975 (T51) :

L'échantillon sec est repris par 200 µl de dichlorométhane et 200 µl d'anhydride trifluoroacétique.

La trifluoroacétylation se déroule à 150°C pendant 5 minutes sur bac à sable. Après refroidissement, les tubes sont replacés 5 minutes dans le bac à sable. Après un nouveau refroidissement, le mélange est prêt à être analysé par chromatographie en phase gazeuse.

## 4 - Chromatographie en phase gazeuse :

Les dérivés trifluoroacétylés des 0-méthylglycosides sont chromatographiés sur une colonne en verre (0,3 x 300 cm) remplie avec l'OV 210 à 5 % (p/p) sur Varapot 30.

L'appareil utilisé est un Varian aérograph modèle 2100 muni d'un détecteur à ionisation de flamme.

La programmation de la température se fait de 110° à 210° à raison de 1 degré par minute. Le débit de l'azote vecteur R est de 7,5 ml/mn.

La figure T16 présente les diagrammes témoins des oses.

Les concentrations en oses sont calculées par rapport au mésoinositol qui sert de témoin interne.

## - BIBLIOGRAPHIE TECHNIQUE -

ACKMAN R.G., HOOPER S.N Additivity of retention data from ethylenic functions in aliphatic Fatty acids. J. Chromatogr., 1973, <u>86</u> , 73-88
BARTSCH G.G Glycolipid abnormalities in a myoclonic variant of late infantile amaurotic idiocy. J. Lip. Res., 1970, <u>11</u> , 241-247
CARTER H.E., HENDRY R.A., STANACEV N.Z Determination of the struc- ture of cerebrosides from wheat flour. J. Biol. Chem., 1961, 236, 1912
CARTER H.E., GAVER R.C Improved reagent for trimethyl silation of sphingolipid bases. J. Lip. Res., 1967, <u>8</u> , 391-395
CARTER H.E., STROBACH D.R., HAWTHORNE J.N Biochemistry of sphingo- lipids. XVIII. Complete structure of tetrasaccharide phyto- glycolipids. Biochem., 1969. 8. 383-388.
COLES L., GRAY G.M Fluorimetric determination of sphingosine and its application to natural mixtures of glycosphingolipids. J. Lip. Res., 1970, <u>11</u> , 164-166
COLES E., FOOTE J.L Glycosphingolipids from rabbit aorta, plasma and red blood cells : effects of high cholesterol, high fat diets on fatty acids distribution and quantity of glycosphin- golipids. J. Lip. Res., 1974, 15, 192-199
DAWIDOWICZ E.A., THOMPSON T.E Artefacts produced by BF <sub>3</sub> methanolysis of a synthetic lecithin containing cyclopropane fatty acids. J. Biol. Chem., 1951, <u>191</u> , 833-841
<pre>FOLCH J., LEES A.M., MEATH J.A., LE BARON F.N Preparation of lipid extracts from brain tissues. J. Biol. Chem., 1951, 191, 833-841</pre>
FOLCH J., LEES A.M., SLOANE S., STANLEY G.H A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. J. Biol. Chem., 1957, 226, 497-509

FOURNET B., FIAF A.M., MONTREUIL J., JOLLES P The sugar part of α caseins from cow milk and colostrum and its microhete- rogeneity.
Biochimie, 1975, <u>57</u> , 161-165 T51
GAVER R.G., SWEELEY C.C Methods for methanolysis of sphingolipids and direct determination of long chain bases by gas liquid chromatography. J. Amer. oil Chem. Soc., 1965, <u>42</u> , 294-298
GREELEY R.H Rapid esterification for gas chromatography. J. Chromatogr., 1974, <u>88</u> , 229-233
HARWOOD J.L., JAMES A.T Metabolism of trans-3-hexa decenoic acid in broad bean. Eut. J. Biochem., 1975, 50, 325-334
HIGASHI S., HORI T Studies on sphingolipids of Fresh water mussel
Biochim. Biophys. Acta, 1968, <u>152</u> , 568-575
HOSHI M., WILLIAMS M., KISHIMOTO Y Esterification of fatty acids at room temperature. J. Lip. Res., 1973, 14, 599-601
JOHNSON A.R., FOGERTY A.G., HOOD R.L., KOZUHAROV S., FORD G.L Gas- liquid chromatography of ethyl ester artefacts formed during
the preparation of fatty acid methyl esters. J. Lip. Res., 1976, <u>17</u> , 431-432
KARAN K., LESTER R.L Characterization of inositol containing phos- phosphingolipids from Tobacco leaves. Plant. Physiol., 1975, 55, 120-129
KARLSSON K.A., MARTENSSON E Studies on sphingosines. XIV. On the phytosphingosine content of the major human kidney glyco-
Biochim. Biophys. Acta, 1968, <u>152</u> , 230-233
KARLSSON K.A., STEEN G.O Studies on sphingosines. XIII. The existence of phytosphingosine in bovine kidney sphingomyelins. Biochim. Biophys. Acta, 1968, <u>152</u> , 798-800
KARLSSON K.A., NILSSON K., SAMUELSSON B.O.E., STEEN G.O The presence of hydroxy fatty acids in sphingomyelins of bovine rennet stomach.
Biochim. Biophys. Acta, 1969, <u>176</u> , 660-663
KARLSSON K.A On the chemistry and occurence of sphingolipid long chain bases.
Chem. phys. lipids, 1970, 5, 6-43

KARLSSON K.A., PASCHER J Thin layer chromatography of ceramides. J. Lip. Res., 1971, <u>12</u> , 466-472
KARLSSON K.A., SAMUELSSON B.O.E., STEEN G.O Sphingolipids composition of bovine kidney cortex, medulla and papilla. Biochim. Biophys. Acta, 1973, <u>316</u> , 317-335
KARLSSON K.A., SAMUELSSON B.O.E., STEEN G.O Detrailed structure of sphingomyelins and ceramides from different regions of bovine kidney with special reference to long chain base. Biochim. Biophys. Acta, 1973, <u>316</u> , 336-362
<pre>KISHIMOTO Y., RADIN N.S A reaction tube for methanolysis instability of hydrogen chloride in methanol. J. Lipid. Res., 1965, 6, 435-436</pre>
KISIC A., RAPPORT M.M Determination of long chain base in glycosphin- golipids with fluorescamine. J. Lipid. Res., 1974, <u>15</u> , 179-180
<pre>KLOPFENSTEIN W.E On methylation of unsaturated fatty acids using boron trihalide methanol reagents. J. Lip. Res., 1972, <u>12</u>, 773-776</pre>
<pre>KWITEROVICH Jr P.O., SLOAN H.O., FREDRICKSON D.S Glycolipid and other lipid constituents of normal human liver. J. Lip. Res., 1970, <u>11</u>, 322-330</pre>
LAUTER C.J., TRAMS E.G A spectrophotometric determination of sphingo- sine. J. Lip. Res., 1972, <u>3</u> , 136-138
LOUGH A.K The production of methoxy substituted fatty acids as arti- facts during the esterification of unsaturated fatty acids, with methanol containing boron tri fluoride. Biochem. J., 1964, <u>90</u> , 40-50
MARINETTI G.V In lipid chromatographic analysis. Vol. I. 1967, ed. G.V. MARINETTI, M. DEKKER, inc N.Y
METCALFE L.D., SCHMITZ A.A The rapid preparation of fatty acids esters for gas chromatographic analysis. Anal. Chem., 1961, <u>33</u> , 363-364
METCALFE L.D., SCHMITZ A.A., PELKA J.R Rapid preparation of fatty acids esters from lipids for gas chromatographic analysis. Anal. Chem., 1966, <u>38</u> , 514-515
MORRISON W.R., SMITH L.M Preparation of fatty acids methylesters and di methyl acetals from lipids with boron fluoride methanol. J. Lip. Res., 1964, 5, 600-608

MORRISON	W.R Polar lipids in bovine milk. I. Long chain bases in sphingomyelin. Biochim. Biophys. Acta, 1969, <u>176</u> , 537-546	т12
NAOI M., 1	LEE Y.C., ROSEMAN S Rapid and sensitive determination of sphingosine base and sphingolipid with fluorescamine. Anal. Biochem., 1974, <u>58</u> , 571-577	T21
POLONOWSK	Y J. – Les sphingolipides. Dans : "Problèmes actuels de Biochimie Générale". Ed. Masson, 1972, 1-12	Т5
RAGHAVAN	S.S., MUMFORD R.A., KANFER J.N Isolation and characterization of glucosyl sphingosine from Gaucher's spleen. J. Lip. Res., 1974, <u>15</u> , 484-490	т11
ROUSER G.	, KRITCHEVSKY G., YAMAMOTO A Column chromatography and asso- ciated procedures for separation and determination of phos- phatides and glycolipids. In : "Lipid chromatographic analysis", 1967, ed. G.V. MARI- NETTI, vol. 1, 99-162. M. DEKKER inc. N.Y	Т18
SIAKOTOS A	A.N Rapid determination of lipids containing free amino groups with trinitrobenzene sulfonic acid reagent. Lipids, 1967, <u>2</u> , 87-88	T27
SIAKOTOS A	A.N., KULKARNI S., PASSO S The quantitative analysis of sphingolipids by determination of long chain base as the trinitrobenzene sulfonic acid derivative. Lipids, 1971, <u>6</u> , 254-259	T28
SLOMIANY 1	B.L., HOROWITZ M.I The glycolipids of bovine serum. Biochim. Biophys. Acta, 1970, <u>218</u> , 278-287	T50
SUGITA M.	, DULANEY J.T., MOSER H.W Structure and composition of sulfa- tides isolated from livers of patients with metachromatic leukodystrophy : galactosyl sulfatide and lactosylsulfatide. J. Lip. Res., 1974, <u>15</u> , 227-233	T8
SUGITA M.	, ITASAKA O., HORI T Branched long chain bases from the bivalue Corbicula sandaï. Chem. phys. Lipids, 1976, <u>16</u> , 1-8	T47
SVENNERHOI	LM L., BRUCE A., MANSSON J.E., RYNMARK B.M., VANIER M.T. – Sphingolipids of human skeletal muscle. Biochim. Biophys. Acta, 1972, 280, 626-636	T14
SWEELEY C	.C., MOSCATELLI E.A Qualitative microanalysis and estimation of sphingolipid bases. J. Lip. Res., 1960, <u>1</u> , 40-47	T48 T34

TAMAI	Y.,	RYUZAKI N	M., KOJIM	A H	Study c	on amphil	oian 1	lipids.	Characte-	
		rization	of monog.	Lycosy:	l cerami	des from	n the	skin o:	f Rana	
		nigromacı	ilata.						•	
		Biochim.	Biophys.	Acta,	1975, 3	398, 294.	-302			T15

VAN	DESSEL G., LAGROU A., HILDERSON H.J., DIERICK W., DACREMONT G	
	Quantitative determination of the neutral glycosylceramides	
	in bovine thyroid gland.	
	Biochimie, 1977, 59, 839-848 7	549
	· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	

----------

