

N° d'ordre : 545

50376
1982
225-1

50376
1982
225-1

THÈSE

présentée à

L'UNIVERSITÉ DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

pour obtenir le titre de

DOCTEUR ES SCIENCES NATURELLES

par

Bernard BRIS

**EVOLUTION DES PROTEINES ET DES LIPIDES
AU COURS DE LA REACTION D'INCOMPATIBILITE
GAMETOPHYTIQUE CHEZ *OENOTHERA MISSOURIENSIS* SIMS,
ESPECE AUTOINCOMPATIBLE.**



Soutenu en juin 1982 devant la Commission d'Examen :

Mlle et MM.

D. COUSTAUT
G. BISERTE
R. BOURIQUET
H.F. LINSKENS
Ph. VERNET

Professeur à l'Université de Lille II
Professeur à l'Université de Lille II
Professeur à l'Université de Lille I
Professeur à l'Université de Nimègue (Pays-Bas)
Professeur à l'Université de Lille I

A Juliette

en témoignage de mon immense affection.

AVANT - PROPOS

La présentation de ce travail me permet d'exprimer ma profonde gratitude aux Maîtres dont j'ai reçu l'enseignement et les précieuses directives ou qui ont accepté de juger ce mémoire.

Je tiens, en premier lieu, à honorer le souvenir de Monsieur le Professeur Robert LINDER qui m'a confié le sujet de Thèse et accueilli dans son Laboratoire. Ses vastes connaissances dans des domaines très variés de la Biologie végétale, son esprit précis et rigoureux ont, notamment, été pour moi un sujet d'admiration et un modèle.

Mademoiselle le Professeur Denise COUSTAUT, Directrice du Laboratoire de Biologie Cellulaire et de Génétique de l'Université de Lille II a bien voulu m'intégrer dans son équipe de recherche. Je la remercie aussi pour avoir dirigé ce travail, pour son enthousiasme communicatif vis-à-vis de la recherche et pour ses précieux conseils dans le domaine biochimique.

A Monsieur le Professeur Robert BOURIQUET, Directeur du Laboratoire de Physiologie végétale de Lille I, je suis, en particulier, redevable de l'aide qu'il m'a spontanément offerte après le décès de Monsieur LINDER. Je le remercie également pour avoir bien voulu juger ce manuscrit.

Monsieur le Professeur Gérard BISERTE, Directeur de l'Institut de Recherche sur le Cancer a accepté, malgré ses lourdes charges, d'être rapporteur. Je l'en remercie vivement.

Monsieur le Professeur Hans-Ferdinand LINSKENS, Directeur de l'Institut de Botanique de l'Université de Nimègue, est mondialement connu par ses travaux sur l'autoincompatibilité de fécondation. Il me fait le grand honneur de participer à ce Jury ; je l'en remercie très sincèrement.

Je suis très reconnaissant à Monsieur le Professeur Philippe VERNET de m'avoir, dès son arrivée à Lille, apporté son soutien et son aide pour la rédaction de ce texte.

J'exprime enfin mes remerciements à tous ceux qui, d'une manière directe ou indirecte, m'ont apporté leur concours et leur soutien. Je suis particulièrement débiteur auprès de Christiane DELBART avec qui je mène, depuis quelques années, une collaboration fructueuse. J'y associe Raymond JEAN qui n'a ménagé ni son temps ni sa peine pour m'aider à réaliser, notamment, les micrographies électroniques, mes Collègues du Laboratoire Paul TOMBAL, Daniel PETIT et Jean DELAY, Mesdames Germaine LECOCQ et Ginette ROELANTS, Messieurs Raymond MAERTEN et Bernard PLANCQ dont la collaboration technique a été précieuse. Que tous soient assurés de ma gratitude et trouvent ici les marques d'estime que je leur porte.

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION.....	1
CHAPITRE I : LE PHENOMENE D'AUTOINCOMPATIBILITE DE FECONDATION.....	4
A - DEFINITIONS.....	4
B - HISTORIQUE.....	5
C - CARACTERISTIQUES CYTO-MORPHOLOGIQUES.....	6
1) <i>les stades de détermination de l'AI.....</i>	6
2) <i>relation de l'AI avec un polymorphisme floral.....</i>	8
3) <i>localisation de la réaction de rejet.....</i>	9
4) <i>relations entre le type d'incompatibilité et le nombre de loci et d'allèles.....</i>	10
5) <i>schéma récapitulatif.....</i>	10
D - DISTRIBUTION DES SYSTEMES AI CHEZ LES ANGIOSPERMES.....	11
E - GENETIQUE DES SYSTEMES AUTOINCOMPATIBLES GAMETOPHYTIQUES.....	12
1) <i>contrôle monofactoriel à allèles multiples.....</i>	13
2) <i>contrôle bifactoriel à allèles multiples.....</i>	15
3) <i>contrôle bifactoriel avec relations épistatiques.....</i>	15
4) <i>AIG tri et tétrafactorielle.....</i>	16
F - MODIFICATION DE LA REPONSE INCOMPATIBLE.....	17
1) <i>méthodes physiologiques.....</i>	17
2) <i>méthodes génétiques.....</i>	23

G - ASPECTS PHYSIOLOGIQUES ET BIOCHIMIQUES DE LA REACTION INCOMPATIBLE.....	26
1) le grain de pollen et la réaction d'autoincompatibilité.....	26
2) la surface stigmatique et la réaction d'incompatibilité.....	31
3) aspects cytologiques et biochimiques.....	32
CHAPITRE II : DETERMINISME DE L'AUTOINCOMPATIBILITE CHEZ <i>OENOTHERA MISSOURIENSIS</i> ET RESULTATS DES TRAVAUX PERSONNELS.....	42
A - DETERMINISME GENETIQUE DE L'AUTOINCOMPATIBILITE.....	43
1) la tétraploïdie expérimentale.....	44
2) la méthode du taux de compatibilité.....	44
B - ETUDE ULTRASTRUCTURALE.....	46
C - PHENOMENES PHYSIOLOGIQUES ACCOMPAGNANT LA REACTION DE REJET : MODIFICATION DU METABOLISME ENERGETIQUE.....	48
1) matériel et méthodes.....	48
2) résultats.....	50
3) conclusions.....	51
D - BIOCHIMIE DE LA REACTION INCOMPATIBLE.....	52
1) bilan des acides aminés.....	52
2) évolution des acides aminés au cours de la pollinisation.....	54
3) analyse des protéines solubles.....	58
4) activités des glycanes hydrolases dans les extraits de styles et du pollen.....	67
5) les phospholipides et l'incompatibilité de fécondation.....	73
6) les glycosphingolipides.....	88
CHAPITRE III : DISCUSSION ET CONCLUSION.....	128
A - RESULTATS DES ANALYSES BIOCHIMIQUES.....	128
1) bilan des acides aminés.....	128
2) analyse des protéines.....	129
3) bilan des analyses lipidiques.....	133
B - INTEGRATION DES RESULTATS DANS LES MODELES EXPLICATIFS DE L'AIG....	141
1) modèles pour la reconnaissance et la régulation de la réponse incompatible des systèmes AIG.....	141
2) comparaison des différents modèles.....	145
BIBLIOGRAPHIE.....	148

CHAPITRE I : LE PHÉNOMÈNE D'AUTOINCOMPATIBILITÉ DE FÉCONDATION.

A. DEFINITION.....	4
B. HISTORIQUE.....	5
C. CARACTERISTIQUES CYTOMORPHOLOGIQUES.....	6
1) Les stades de détermination de l'AI.....	6
<i>a-dans le pistil</i>	
<i>b-dans les étamines</i>	
2) Relations de l'AI avec un polymorphisme floral.....	8
3) Localisation de la réaction de rejet.....	9
<i>a-inhibition stigmatique</i>	
<i>b-inhibition stylaire</i>	
<i>c-inhibition dans l'ovaire</i>	
4) Relations entre le type d'incompatibilité et le nombre de loci et d'allèles.....	10
5) Schéma récapitulatif des caractères cytomorphologiques associés aux deux types d'incompatibilité.....	10
D. DISTRIBUTION DES SYSTEMES AI CHEZ LES ANGIOSPERMES.....	11
E. GENETIQUE DES SYSTEMES AUTOINCOMPATIBLES GAMETOPHYTIQUES.....	12
1) Contrôle monofactoriel à allèles multiples.....	13
2) Contrôle bifactoriel à allèles multiples.....	15

3) Contrôle bifactoriel avec relations épistatiques.....	15
4) AIG tri et tétrafactorielle.....	16
F. MODIFICATION DE LA REPOSE INCOMPATIBLE.....	17
1) Méthodes physiologiques.....	17
<i>a-effets de l'âge</i>	
<i>b-chocs thermiques</i>	
<i>c-utilisation d'hormones et d'inhibiteurs</i>	
<i>d-action de l'anhydride carbonique</i>	
<i>e-effet des radiations ionisantes</i>	
<i>f-stimulation électrique</i>	
<i>g-expériences de greffe</i>	
<i>h-mutilations et injections</i>	
<i>i-fécondation in vitro</i>	
2) Méthodes génétiques.....	23
<i>a-polyploïdisation</i>	
<i>b-l'autoincompatibilité chez les triploïdes et les trisomiques</i>	
<i>c-mutations au locus S</i>	
G. ASPECTS PHYSIOLOGIQUES ET BIOCHIMIQUES DE LA REACTION INCOMPATIBLE....	26
1) Le grain de pollen et la réaction d'autoincompatibilité.....	26
<i>a-cytologie du pollen et incompatibilité</i>	
<i>b-structure de la paroi du pollen</i>	
<i>c-émission de protéines issues du pollen</i>	
<i>d-localisation et caractérisation des protéines émises</i>	
2) La surface stigmatique et la réaction d'incompatibilité.....	31
<i>a-les stigmates sécréteurs</i>	
<i>b-les stigmates non sécréteurs</i>	
3) Aspects cytologiques et biochimiques de la réaction d'auto- incompatibilité.....	32
<i>a-incompatibilité sporophytique</i>	
<i>b-incompatibilité gamétophytique.</i>	

INTRODUCTION

Une des caractéristiques essentielles de la reproduction sexuée repose sur l'aptitude que possèdent les organismes à reconnaître et à sélectionner les gamètes qui vont effectuer la fécondation. Ce pouvoir de reconnaissance et de rejet est indispensable pour remplir deux fonctions fondamentales : maintenir la stabilité de l'espèce et permettre un degré de variabilité génétique suffisant à l'intérieur d'une espèce.

Parmi les mécanismes qui se sont dégagés au cours de l'évolution, l'autoincompatibilité de fécondation réalise, dans de nombreuses familles d'Angiospermes (ainsi que de Cryptogames comme l'ont défini ESSER et KUENEN en 1967), cette seconde fonction. En effet, ce processus autorise un régime de reproduction qui aboutit à renforcer l'hétérozygotie.

L'autoincompatibilité de fécondation (AI) est assurée par une fonction ou un ensemble de fonctions génétiques qui dépend d'allèles d'incompatibilité ; l'évolution favorise constamment l'introduction de nouveaux allèles ; si une mutation aboutit à un nouvel allèle fonctionnel, il est retenu dans la population et sa fréquence augmente ; si l'allèle est récessif, non fonctionnel, le végétal devient alors, en général, totalement autocompatible.

Pendant la première moitié du 20ème siècle, de nombreuses données ont été accumulées sur le contrôle génétique des mécanismes de l'incompatibilité et ses variations d'expression en fonction de l'environnement (chapitre I, paragraphes E et F). Les trois dernières décades ont vu fleurir, au fur et à mesure des acquisitions de la génétique, toute une série de modèles biochimique (chapitre III, paragraphe B) visant à expliciter, au niveau du génome, le déroulement des évènements physiologiques et métaboliques qui se succèdent lorsqu'un grain de pollen arrive au contact d'un stigmate d'une plante de la même espèce.

Notre travail représente une contribution à l'étude de la biochimie de l'autoincompatibilité de fécondation chez *Oenothera missouriensis*, espèce retenue pour les raisons suivantes :

- le contrôle génétique de l'incompatibilité est bien établi ; des clones porteurs d'allèles S définis ont été isolés ;
- les variations d'expression de la réaction de rejet ont fait l'objet d'observations antérieures ;
- les données concernant les processus d'inhibition des autotubes polliniques sont encore fragmentaires.

L'objectif du présent travail est d'analyser les modifications liées au phénomène d'autoincompatibilité : la réaction est déclenchée par un signal de reconnaissance déterminant une vague de perturbations métaboliques qui va aboutir à l'arrêt de croissance du tube pollinique : il s'agit donc de déterminer les processus biochimiques à l'origine du blocage.

Plus précisément, les questions auxquelles nous avons essayé de répondre sont les suivantes :

- la réaction d'incompatibilité est-elle liée à une modification du métabolisme énergétique ? en cas de réponse positive, à quel niveau ?
- existe-t-il des métabolites spécifiques en relation avec les allèles d'incompatibilité ?
- la déviation du métabolisme glucidique observée dans les tubes polliniques incompatibles (dépôts de "bouchons" de callose à leur extrémité) peut elle être expliquée par une modification d'activité d'enzymes ? lesquels ?
- les changements de propriétés membranaires (en particulier de perméabilité) seraient en relation avec l'auto-fécondation (HAVEZ, 1967). Ces modifications s'expriment-elles dans la structure des phospholipides et des glycosphingolipides ?

L'étude de ces différentes questions a été abordée. Elle nous a amené à utiliser un arsenal varié de techniques d'analyses (détaillées dans l'appendice technique).

Après une revue des données actuelles concernant l'incompatibilité et ses modalités d'expression génétiques et physiologiques, nous consacrons une partie de ce travail à l'état des connaissances du mécanisme d'incompatibilité chez *Oenothera missouriensis* avant d'exposer les résultats expérimentaux obtenus et leur intégration dans les modèles biochimiques rendant compte du phénomène.

CHAPITRE I : LE PHENOMENE D'AUTOINCOMPATIBILITE DE FECONDATION

A. DÉFINITIONS

L'autoincompatibilité de fécondation (AI) chez les Angiospermes, phénomène biologique découvert dès 1764 par KÖLREUTER, a été définie par EAST et PARK en 1917, comme "l'impossibilité pour le pollen de féconder l'ovule", par "l'incapacité pour des gamètes mâles et femelles à réaliser la fécondation après pollinisation ou croisement, alors que chacun d'entre eux est capable de l'accomplir après union avec d'autres gamètes issus de plantes de la même espèce, suivant un croisement ou une pollinisation se réalisant dans les mêmes conditions" (MATHER, 1943), par "l'obstacle à la fécondation" (LEWIS, 1949a).

Plus récemment, BREWBAKER (1957), LUNDQVIST (1964) et HESLOP-HARRISON (1975) ont défini l'autoincompatibilité comme l'incapacité partielle ou totale, pour une plante hermaphrodite, de donner des zygotes ou des graines viables après autopollinisation, bien que leurs gamètes soient physiologiquement fonctionnels. La fécondation n'est possible, dans certaines conditions qui seront précisées ultérieurement, qu'entre des gamètes issus de plantes différentes, en "xénopollinisation".

SCOTT (1865), DARWIN (1876), EAST (1940) ont appelé ce processus "autostérilité"; le terme autoincompatibilité est préférable car il permet

d'exprimer des degrés de fertilité variables ; de plus, l'expression auto-stérilité est souvent utilisée dans un sens plus large et comprend en particulier la stérilité provenant d'anomalies chromosomiques, de la production de gamètes non fonctionnels ou de déficiences postérieures à la fécondation (CRANE et BROWN, 1937 ; CRANE et LAWRENCE, 1952 ; WILLIAMS, 1964).

La létalité zygotique n'est pas comprise dans l'AI. En effet, à la seule exception de *Borago officinalis* où CROWE (1971) a mis en évidence un système de rejet postérieur à la fécondation, il apparaît que tous les systèmes autoincompatibles connus interviennent à un stade prézygotique.

L'AI est très répandue chez les Angiospermes puisqu'on la retrouve dans plus de 3 000 espèces, appartenant à 350 genres, distribués dans 70 familles (GAGNIEU, 1950 ; BREWBAKER, 1957, LINSKENS et KROH, 1967).

B. HISTORIQUE

Depuis la découverte du phénomène par KÖLREUTER en 1764 chez *Verbascum phoeniceum*, la liste des travaux sur l'origine, la nature, la distribution et les caractéristiques de l'autoincompatibilité est longue et une revue exhaustive s'avère très difficile. Il faut cependant noter que Charles DARWIN a étudié l'AI de façon approfondie comme le prouvent les nombreux articles publiés à ce sujet en 1876, 1877 et 1880 notamment. C'est également DARWIN qui a mis en évidence l'hétérostylie et qui a posé le problème des effets de l'environnement sur l'incompatibilité.

Il faut aussi citer les travaux de CORRENS (1913), EAST et PARK (1917) et STOUT (1917). Par ailleurs, EAST et MANGELSDORF (1925) ont été les premiers à analyser le déterminisme génétique de ce phénomène.

Du point de vue évolutif, l'autoincompatibilité est l'un des mécanismes qui, avec d'autres, tels que la dichogamie, la dioécie et les diverses particularités de la structure florale, permet d'assurer un degré élevé d'hétérozygotie dans une population ; le fait de privilégier le croisement par des gamétophytes provenant de la même espèce, mais d'individus différents, est un élément important dans la détermination de la capacité de réponse à la

sélection et donc dans la potentialité évolutive d'une espèce (MATHER, 1943). WHITEHOUSE (1950) a émis l'idée selon laquelle l'adoption de l'AI par les Angiospermes, à un stade primitif, comme mécanisme favorisant l'hétérozygotie a joué un rôle décisif dans l'expansion de ce phylum. WHITEHOUSE a en effet établi que 70 % des genres contiennent exclusivement des espèces dioïques ; une telle proportion n'a pu apparaître que si l'AI, le mécanisme le plus susceptible de favoriser la xénopollinisation, est intervenue. Il faut également remarquer que ce type de croisement est en relation étroite avec l'évolution d'insectes pollinisateurs spécialisés (GRANT, 1949).

Tous les systèmes AI sont basés sur le fait que l'identité entre le génotype du pollen et celui du pistil, pour le (ou les) gène(s) qui contrôle(nt) la réaction d'incompatibilité, conduit à l'impossibilité de produire un zygote ; ceci implique une participation du pollen et des éléments du pistil avant la fécondation. La réaction diffère de la stérilité mâle ou femelle et de la létalité récessive embryonnaire ; elle aboutit au rejet de ce qui est reconnu semblable à soi : c'est l'auto-rejet qui peut se manifester selon diverses modalités. La classification des systèmes autoincompatibles est facilitée par le fait qu'il existe une correspondance remarquable entre l'AI et certaines caractéristiques cyto-morphologiques, reflétant des différences d'ordre génétique.

C. CARACTÉRISTIQUES CYTOMORPHOLOGIQUES

Il existe plusieurs types de réactions incompatibles présentant des particularités en relation, notamment, avec le stade de détermination.

I - LES STADES DE DETERMINATION DE L'AI

a) Dans le pistil.

La détermination du phénotype incompatible, dans le pistil, coïncide avec l'ouverture de la fleur ; avant et après ce stade, les pistils de plantes incompatibles peuvent quelquefois accepter un auto-pollen et produire une semence "illégitime".

b) Dans les étamines.

Le stade au cours duquel le gamétophyte mâle reçoit l'information nécessaire à la détermination du phénotype incompatible varie ; on distingue :

- l'autoincompatibilité sporophytique (AIS) pour laquelle le phénotype auto-incompatible du pollen est déterminé par le génotype de la plante ;
- l'autoincompatibilité gamétophytique (AIG) où c'est le génotype de chaque microspore qui est déterminant.

Dans le premier cas (AIS), la détermination est préméiotique ou tout au plus méiotique. HESLOP-HARRISON (1968) a, en effet, observé, chez *Lilium*, le transfert de substances, élaborées par les cellules du tapis, dans les microspores au cours de leur maturation ; ces matériaux passant du tapis dans les cavités de l'exine doivent être responsables à la réaction de réponse autoincompatible, localisée dans ce cas sur les papilles stigmatiques (HESLOP-HARRISON et coll., 1974) ; d'autre part, DICKINSON et LEWIS (1975) ont démontré que des extraits issus du tapis induisent une réaction de type incompatible au niveau du stigmate en l'absence de tout grain de pollen.

PANDEY (1970) prenant en considération la complexité des relations entre les systèmes génétiques de contrôle de l'AIS, la morphologie florale, la cytologie du pollen et le site de l'inhibition pollinique, situe la détermination du phénotype incompatible à un stade préméiotique.

Dans le cas de l'AIG, cette détermination interviendrait immédiatement après la méiose, avant la formation des microspores (LEWIS, 1949a ; PANDEY, 1960-1970). Ces auteurs ont, en effet, mis en évidence que des radiations mutagènes appliquées après la méiose ne provoquent plus de mutations phénotypiquement notables des gènes d'AI.

BREWBAKER (1957, 1959) estime que le stade de détermination se situe à la deuxième mitose pollinique et intervient dans les microspores pour les espèces à pollen binucléé et dans le tube pollinique pour les espèces dont le pollen est trinuculé. Son hypothèse est essentiellement basée sur les étroites relations qui existent entre la deuxième mitose (dans le pollen ou le tube pollinique) et le site de la réaction d'AI (style ou stigmate) ; selon cet auteur, la croissance des tubes polliniques dépendrait de la concentration d'un facteur de croissance du pollen (pollen growth factor : PGF) dont le taux est maximum au moment de la deuxième mitose et qui ne peut plus être produit, utilisé ou transféré au pollen en cas de pollinisation incompatible. Autrement

dit, l'action des gènes d'incompatibilité coïncide avec les besoins en PGF.

Ces besoins se font sentir à des moments différents dans les deux cas : soit au niveau du grain de pollen sur le stigmate pour le pollen trinué, soit dans le tube pollinique en cours de croissance dans le style (pollen binué).

II - RELATION DE L'AI AVEC UN POLYMORPHISME FLORAL

Alors que tous les systèmes AIG sont homomorphiques, il existe des espèces pour lesquelles l'AI associe aux mécanismes de rejet de "l'auto-pollen", un certain nombre de différences dans la morphologie florale qui renforcent la xénopollinisation. De tels dispositifs sont appelés hétéromorphiques (FISHER et MATHER, 1943) et sont strictement liés à l'autoincompatibilité sporophytique (PANDEY, 1970).

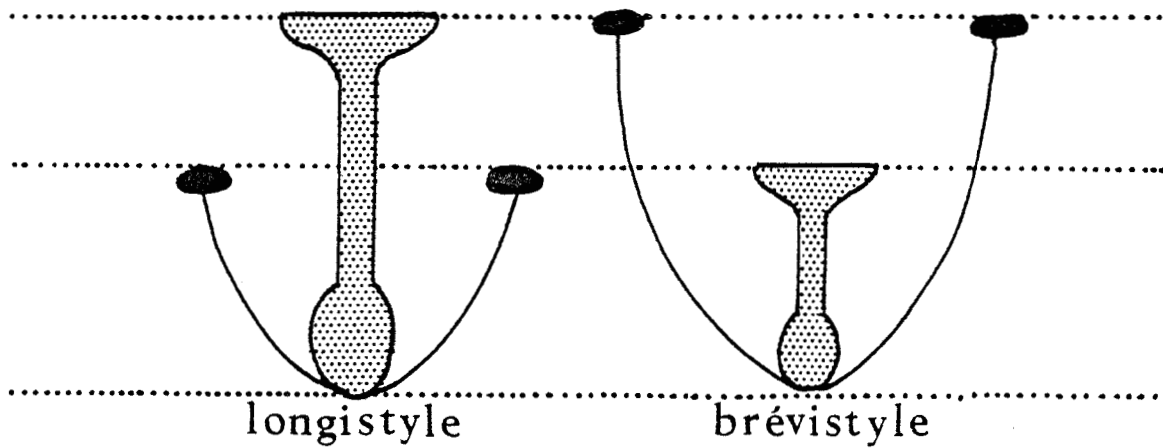
L'existence de fleurs différentes chez des plantes appartenant à une même population avait déjà retenu l'attention de DARWIN (1877) qui appela "hétérostyles" les espèces comportant des plantes qui diffèrent par la variabilité des longueurs de styles et des filets d'anthères ; de telles espèces peuvent être distyliques avec deux types d'architecture florale (longistyle ou brévistyle) ou tristyliques avec 3 groupes caractérisés par des fleurs à styles courts, moyens et longs, chaque fleur portant des anthères à 2 niveaux différents ne correspondant pas à celui du stigmate (figure 1).

Dans le cas de la distylie, les croisements entre plantes à morphologie florale identique n'aboutissent pas alors que les pollinisations entre plantes possédant un phénotype différent (longistyle - brévistyle ou brévistyle - longistyle) sont efficaces ; pour les espèces tristyliques, le croisement n'est possible qu'entre des pistils et du pollen situés à un même niveau dans la fleur.

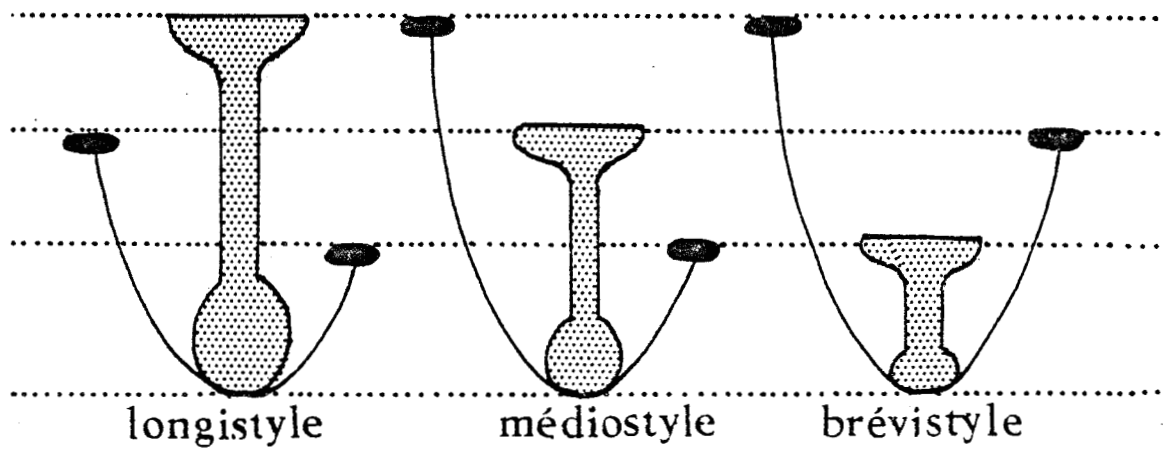
Chez les espèces hétérostyles, l'incapacité de fécondation dépend de caractéristiques anatomiques (taille des grains de pollen, ornements de l'exine, dimensions des papilles stigmatiques) (ex : chez *Fagopyrum esculentum*), physiologiques (pression osmotique plus élevée dans les cellules stigmatiques des longistyles chez *Linum grandiflorum*) ou de la conjugaison de ces deux caractéristiques (HEITZ, 1972).

FIGURE 1 : REPRÉSENTATION SCHÉMATIQUE DE LA DISTYLIE ET DE LA TRISTYLIE

DISTYLIE



TRISTYLIE



III - LOCALISATION DE LA REACTION DE REJET

La réaction de rejet peut avoir lieu dans différentes parties du pistil et à des temps variables de la phase progamique. LINSKENS (1972) a distingué 3 sites d'inhibition : au niveau du stigmate, du style ou de l'ovaire (figure 2).

a) Inhibition stigmatique.

La germination du pollen incompatible peut être totalement bloquée au niveau du stigmate ; les rares tubes polliniques formés sont courts et recroquevillés ; ils ne pénètrent pas dans les papilles stigmatiques ; l'arrêt de la croissance du tube pollinique coïncide avec la formation à son extrémité d'un dépôt de callose.

BREWBAKER (1957-1959) a établi une relation remarquable entre la cytologie des grains de pollen et le site de l'expression du gène ; il a, en effet, montré que les 17 genres connus présentant l'incompatibilité stigmatique produisent du pollen trinué alors que 33 des 36 genres présentant une inhibition stylaire ou au niveau de l'ovaire, ont du pollen binué. BREWBAKER a d'autre part mis en évidence que le pollen trinué se différencie par un pouvoir germinatif faible *in vitro* ; cet auteur a émis l'hypothèse selon laquelle le pollen trinué est bloqué sur le stigmate car il ne peut continuer à germer sans qu'un stimulus, probablement inhibé par la réaction d'autoincompatibilité, soit donné par le pistil.

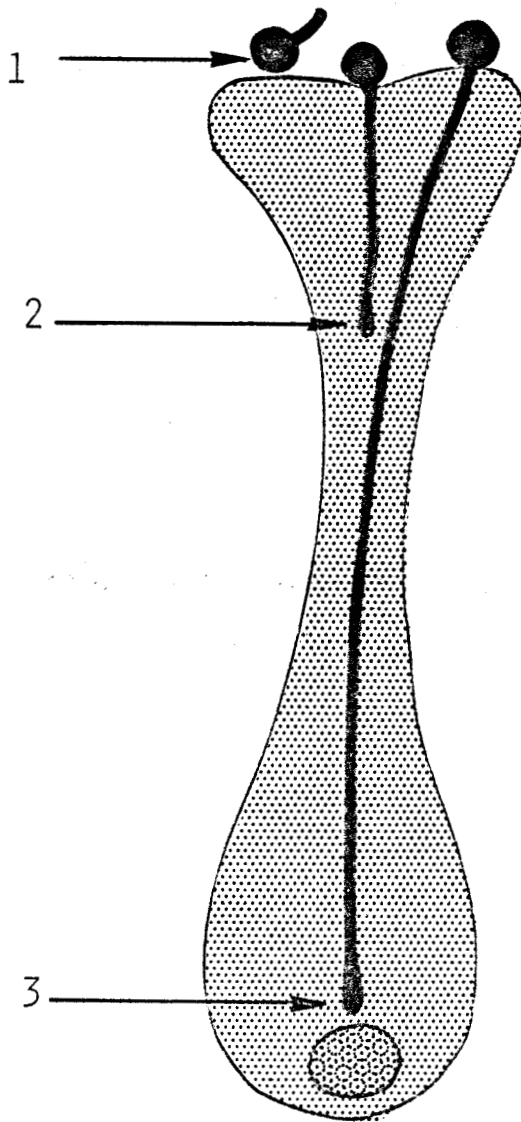
Une autre relation importante a été mise en évidence : le blocage stigmatique apparaît pour les seuls systèmes AIS, à l'exception des Graminées (LUNDQVIST, 1965, 1968) ; comme les espèces de cette famille possèdent un pollen trinué, ce fait confirme la théorie de PANDEY (1970) selon laquelle la cytologie du pollen et le site d'expression sont liés.

b) Inhibition stylaire.

Le tube pollinique, issu de la germination du pollen incompatible, traverse le stigmate et pénètre dans le style, mais la vitesse de croissance diminue progressivement et il y a finalement arrêt ; le blocage peut se réaliser à l'entrée du style (*Oenothera*) ou dans le style (*Petunia*). A l'examen microscopique, le tube pollinique incompatible présente des parois épaissies et des bouchons de callose obstruent sa partie apicale (LINSKENS et KROH, 1967).

FIGURE 2 :

LOCALISATION DES BARRIERES D' INCOMPATIBILITE
D'APRES LINSKENS 1972



- 1 INHIBITION DE LA GERMINATION DU GRAIN DE POLLEN
- 2 INHIBITION DE LA CROISSANCE DU TUBE POLLINIQUE
- 3 PREVENTION DE LA FUSION DES GAMETES

Le tube pollinique compatible présente une vitesse de croissance pouvant atteindre 1 cm/h chez *Oenothera missouriensis* (DELAY et LINDER, 1969) ; il passe entre les cellules du tissu conducteur en dissolvant le matériel intercellulaire (pectine principalement) à l'aide d'enzymes spécifiques.

En incompatibilité il n'y a aucune partie du style prépondérante dans la réaction de rejet ; de plus, le blocage ne dépend pas d'une substance inhibitrice qui diffuserait de l'ovaire. Le blocage des tubes polliniques dans le style n'existe que pour les systèmes gamétophytiques et pour les plantes présentant un pollen binucléé (à l'exception de quelques genres comme *Beta*, *Helianthes* et *Fagopyrum*).

C'est le cas d'*Oenothera missouriensis* (LINDER, 1952) ; il a été également étudié chez *Veronica* (FILZER, 1926) et *Nicotiana* (EAST et MANGELSDORF, 1925).

c) Inhibition dans l'ovaire.

Les tubes polliniques atteignent le sac embryonnaire mais la libération des gamètes n'est pas suivie de syngamie. Dans la plupart des cas, ce type d'inhibition, par blocage au niveau de l'ovaire, caractérise les fleurs à styles creux (BREWBAKER, 1957) et se rencontre chez les genres *Narcissus*, *Hemerocallis*, *Lilium*, *Gasteria*, *Anona* (BATEMAN, 1954 ; ARASU, 1968). La détermination de ce type d'autoincompatibilité serait à la fois gamétophytique et sporophytique (COPE, 1962).

IV - RELATIONS ENTRE LE TYPE D'INCOMPATIBILITE ET LE NOMBRE DE LOCI ET D'ALLELES

Les systèmes autoincompatibles peuvent être classés, sur la base de leurs caractéristiques génétiques, en deux groupes distincts :

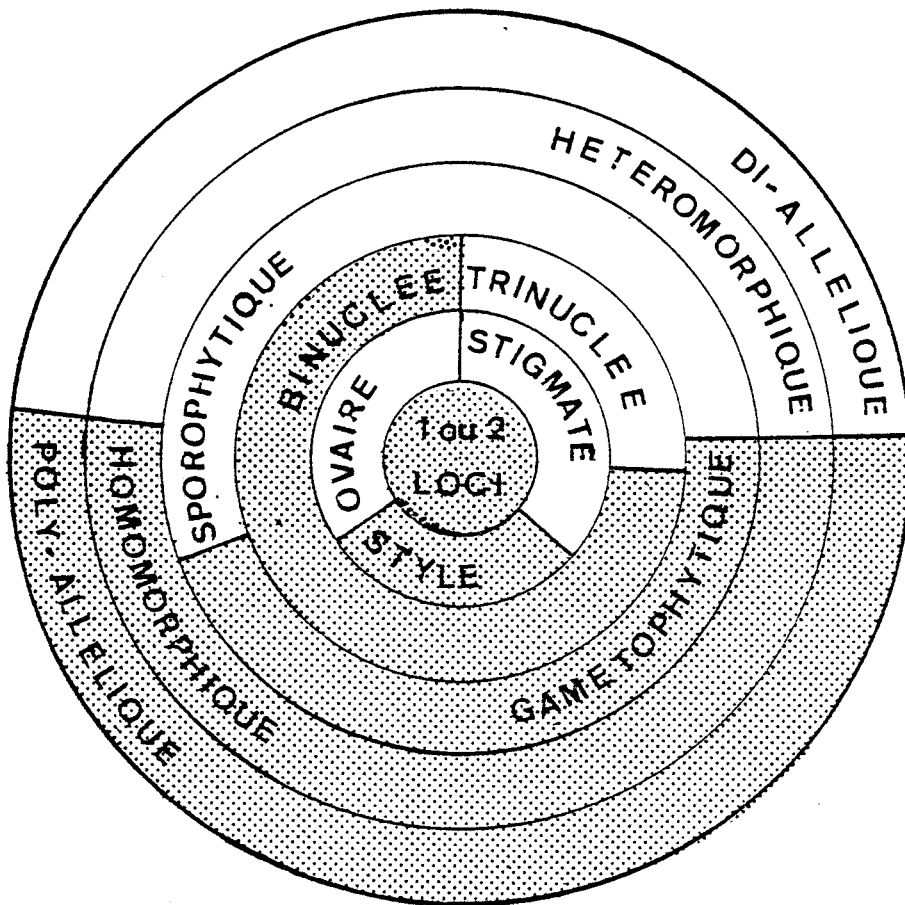
- 1) un groupe présentant des séries polyalléliques à un, deux ou plusieurs loci au sein duquel figurent les espèces AIG et les espèces AIS homomorphiques ;
- 2) un groupe à deux allèles par locus et à un ou plusieurs loci, dans les systèmes AIS hétéromorphiques.

V - SCHEMA RECAPITULATIF DES CARACTERES CYTO-MORPHOLOGIQUES ASSOCIES AUX DEUX TYPES D'INCOMPATIBILITE

De NETTANCOURT (1972) a proposé le schéma récapitulatif suivant (figure 3) des principales caractéristiques des systèmes AI.

FIGURE 3 :

CLASSIFICATION DES SYSTEMES D'AUTO-INCOMPATIBILITE
SELON DE NETTANCOURT (1972)



Ce schéma, repose sur l'existence d'un ou deux loci, la localisation de la réaction de rejet, la cytologie du pollen, le stade de détermination, la relation avec des caractères morphologiques, la présence ou l'absence de séries polyalléliques. Il souligne l'importance de la cytologie du pollen car l'association entre pollen trinué, inhibition stigmatique et contrôle sporophytique est presque toujours la règle.

Une corrélation très importante que n'indique pas la figure 3 concerne l'état du stigmate ; HESLOP-HARRISON (1975a) a montré clairement que tous les systèmes sporophytiques sont en relation avec un stigmate non sécréteur. Au contraire, une surface stigmatique sécrétrice est l'indication d'un système gamétophytique.

D. DISTRIBUTION DES SYSTÈMES AI CHEZ LES ANGIOSPERMES

Le tableau 4 répertorie les familles d'Angiospermes présentant l'AI, soit homomorphe, soit hétéromorphe.

Il faut noter que le phénomène se retrouve dans la plupart des familles d'arbres et que le mécanisme du rejet tend à être le même à l'intérieur des espèces composant une famille. Ainsi, les Légumineuses et les Solanacées sont caractérisées par l'AIG monofactorielle, les Graminées par l'AIG bifactorielle. Les Crucifères et les Composées présentent le plus souvent le système AIS homomorphe, tandis que les Linacées, les Lythracées et les Oxalidacées sont hétéromorphes.

Ceci n'est cependant pas une règle absolue et le tableau 4 montre qu'il existe au moins 6 familles (Boraginacées, Saxifragacées, Rubiacées, Oléacées, Apocynacées, Polygonacées) possédant à la fois les systèmes homomorphes et hétéromorphes.

REMARQUE : l'autoincompatibilité chez les plantes cultivées.

L'AI se retrouve également chez les espèces cultivées (tableau 5).

TABLEAU 4 : RÉPARTITION DES TYPES D'AUTOINCOMPATIBILITÉ, HOMO ET HÉTÉROMORPHIQUES CHEZ LES ANGIOSPERMES (D'APRÈS EAST, 1940 ; BREWBAKER, 1959 ET VUILLEUMIER, 1965).

Ordre	Famille	Type d'autoincompatibilité	
		Homomorphique	Hétéromorphique
Liliales	<i>Iridaceae</i>	+	
	<i>Amaryllidaceae</i>	+	
	<i>Liliaceae</i>	+	
Commelinales	<i>Commelinaceae</i>	+	
	<i>Bromeliaceae</i>	+	
Graminales	<i>Gramineae</i>	+	
Zingiberales	<i>Zingiberaceae</i>	+	
Orchidales	<i>Orchidaceae</i>	+	
Nymphaeales	<i>Nymphaeaceae</i>	+	
Theales	<i>Theaceae</i>	+	
Malvales	<i>Sterculiaceae</i>	+	
	<i>Bombaceae</i>	+	
	<i>Malvaceae</i>	+	
Ericales	<i>Ericaceae</i>	+	
Primulales	<i>Primulaceae</i>	+	
Cistales	<i>Passifloraceae</i>	+	
	<i>Cisteaceae</i>	+	
Capparidales	<i>Resedaceae</i>	+	
	<i>Cruciferae</i>	+	
Cucurbitales	<i>Begoniaceae</i>	+	
Rosales	<i>Saxifragaceae</i>	+	+
	<i>Rosaceae</i>	+	
Leguminosales	<i>Leguminosae</i>	+	
Geraniales	<i>Tropaeolaceae</i>	+	
	<i>Geraniaceae</i>	+	
	<i>Oxalidaceae</i>		+
	<i>Linaceae</i>		+
Scrophulariales	<i>Solanaceae</i>	+	
	<i>Nolanaeae</i>	+	
	<i>Scrophulariaceae</i>	+	
	<i>Bignoniaceae</i>	+	
	<i>Lentibulariaceae</i>	+	
	<i>Acanthaceae</i>	+	
Gentianales	<i>Plantaginaceae</i>	+	
	<i>Oleaceae</i>	+	+
	<i>Loganiaceae</i>	+	
	<i>Gentianaceae</i>		+
	<i>Apocynaceae</i>	+	+
	<i>Asclepiadaceae</i>	+	
Lamiales	<i>Verbenaceae</i>	+	
	<i>Labiatae</i>	+	
Polemoniales	<i>Polemoniaceae</i>	+	
	<i>Convolvulaceae</i>	+	
	<i>Boraginaceae</i>	+	+
Campanulales	<i>Campanulaceae</i>	+	
	<i>Goodeniaceae</i>	+	
Asterales	<i>Compositae</i>	+	
Rubiales	<i>Rubiaceae</i>	+	+
	<i>Caprifoliaceae</i>	+	
Myrtales	<i>Lythraceae</i>		+
	<i>Myrtaceae</i>	+	
	<i>Onagraceae</i>	+	
Umbellales	<i>Cornaceae</i>	+	
Ranales	<i>Ranunculaceae</i>	+	
Papaverales	<i>Papaveraceae</i>	+	
	<i>Fumariaceae</i>	+	
Caryophyllales	<i>Plumbaginaceae</i>		+
Polygonales	<i>Polygonaceae</i>	+	+
Hamamelidales	<i>Hamamelidaceae</i>	+	
Urticales	<i>Ulmaceae</i>	+	
	<i>Moraceae</i>	+	
Fagales	<i>Fagaceae</i>	+	
Betulales	<i>Betulaceae</i>	+	

Il faut remarquer que certaines d'entre elles comme le Trèfle, l'Alfa, le Chou frisé, le Tournesol sont à différents degrés soit complètement, soit partiellement autocompatibles.

Le système d'auto-rejet est souvent limité aux espèces diploïdes, car la polyploïdie détermine généralement une levée de l'AI ou la transmission de barrières à la reproduction complexes et irrégulières. Du fait de la polyploïdie fréquente des plantes cultivées, l'autoincompatibilité est moins répandue que chez les espèces sauvages et elle est souvent remplacée par une pseudocompatibilité.

Les 2 types d'autoincompatibilités, gamétophytique et sporophytique, correspondent à des modes de rejet dont l'origine, le déterminisme, le mécanisme et les manifestations sont différentes. *Oenothera missouriensis*, notre matériel d'étude, présentant l'AIG, nous limiterons l'étude du déterminisme génétique à ce seul type.

E. GÉNÉTIQUE DES SYSTÈMES AUTOINCOMPATIBLES GAMÉTO-PHYTIQUES

Le schéma récapitulatif de De NETTANCOURT (figure 3) met en évidence que les systèmes AIG font tous partie du groupe à un ou deux loci pouvant présenter des séries polyalléliques.

Des relations entre les allèles d'un même locus peuvent exister ; ce sont des relations d'indépendance, de dominance ou d'interaction mutuelle. Des relations entre différents loci peuvent se présenter lorsque l'AI est sous la dépendance de plusieurs loci ; ce sont des relations d'indépendance, d'interaction complémentaire ou d'épistasie. Le locus génétique impliqué dans l'autoincompatibilité monofactorielle est appelé S (comme stérilité) et l'allèle récessif, dans les systèmes dialléliques, s. Dans les séries polyalléliques et sans tenir compte des relations de dominance, chaque allèle est désigné par la lettre S suivie d'un numéro (S_1, S_2, S_3 , etc...). Lorsque la réaction est sous la dépendance de plus d'un locus, l'un est appelé S, l'autre Z (Graminées), R chez *Physalis* (PANDEY, 1962), M chez *Lythrum* (ERNST, 1936) ou T chez *Capsella* (RILEY, 1936). Si les 2 loci possèdent des séries alléliques, celles-ci sont définies par numérotation.

TABLEAU 5 : SYSTÈMES D'AUTOINCOMPATIBILITÉ CHEZ QUELQUES GENRES DE PLANTES CULTIVÉES.

GENRE	SYSTEME D'AUTOINCOMPATIBILITE
<i>Beta</i>	Homomorphique, plurifactoriel (au moins 4 loci) et probablement gamétophytique
<i>Brassica</i>	Homomorphique, unifactoriel, sporophytique
<i>Coffea</i>	Homomorphique, gamétophytique
<i>Dactylis</i>	Homomorphique, bi-factoriel, gamétophytique
<i>Fagopyrum</i>	Hétéromorphique, unifactoriel, sporophytique
<i>Festuca</i>	Homomorphique, bi-factoriel, gamétophytique
<i>Helianthus</i>	Homomorphique, probablement sporophytique
<i>Hordeum</i>	Homomorphique, bi-factoriel, gamétophytique
<i>Linum</i>	Hétéromorphique, unifactoriel, sporophytique
<i>Lotus</i>	Homomorphique, unifactoriel, gamétophytique
<i>Lycopersicum</i>	Homomorphique, unifactoriel, gamétophytique
<i>Medicago</i>	Homomorphique, unifactoriel, gamétophytique
<i>Nicotiana</i>	Homomorphique, unifactoriel, gamétophytique
<i>Phalaris</i>	Homomorphique, bi-factoriel, gamétophytique
<i>Prunus</i>	Homomorphique, unifactoriel, gamétophytique
<i>Pyrethrum</i>	Homomorphique, sporophytique
<i>Pyrus</i>	Homomorphique, gamétophytique
<i>Raphanus</i>	Homomorphique, unifactoriel, sporophytique
<i>Secale</i>	Homomorphique, bi-factoriel, gamétophytique
<i>Solanum</i>	Homomorphique, bi-factoriel, gamétophytique
ou	Homomorphique, unifactoriel, gamétophytique
<i>Theobroma</i>	Homomorphique, sporophytique
<i>Trifolium</i>	Homomorphique, unifactoriel, gamétophytique

BMS
1112

($S_2Z_3, S_6Z_4\dots$). Le nombre d'allèles dans les séries multialléliques peut être élevé (jusqu'à plusieurs centaines dans une population de *Trifolium repens*) (BATEMAN, 1947).

Nous envisagerons successivement les différents cas en fonction du nombre de loci impliqués et de la complexité des relations entre allèles d'un même gène.

I - CONTROLE MONOFACTOIRIEL A ALLELES MULTIPLES

Depuis les travaux de EAST et MANGELSDORF (1925) sur *Nicotiana scanderae* et de FILZER (1926) sur *Veronica syriaca*, on sait que la réaction d'inhibition peut dépendre d'un seul gène S : le grain de pollen germe et peut féconder à condition de ne porter aucun allèle S présent dans le tissu diploïde femelle. Ainsi, les plantes porteuses des allèles S_1S_2 ne peuvent être fertilisées par un pollen ayant les mêmes allèles soit S_1 soit S_2 ; par contre elle peuvent l'être par tout autre pollen porteur des allèles S_3, S_4, \dots

Il existe donc 3 types de pollinisation (figure 4) :

- une pollinisation incompatible caractéristique de l'autopollinisation, se rencontrant également entre des plantes porteuses d'allèles S identiques ;
- une pollinisation semi-compatible entre des plantes possédant un seul allèle S en commun ;
- une pollinisation compatible entre des individus ne possédant aucun allèle commun (figure 6) ;

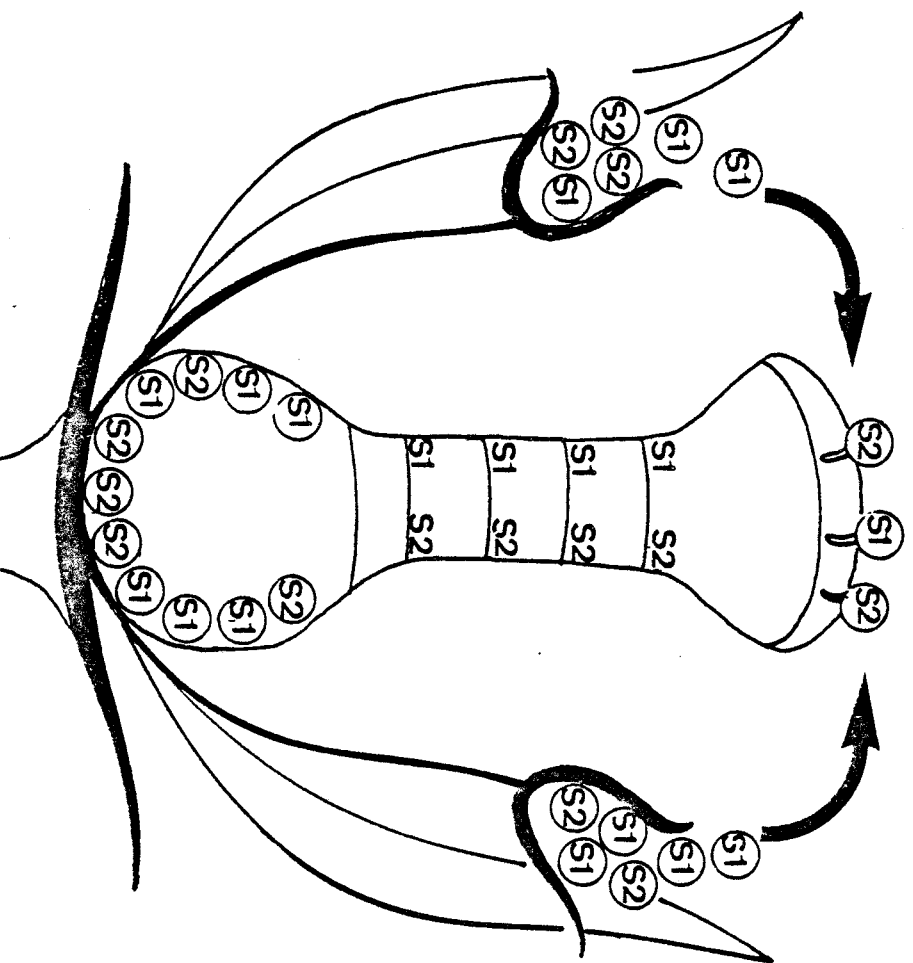
Si une plante S_1S_2 est croisée avec une plante de génotype S_3S_4 , le schéma de fécondation sera :

♀ \ ♂	S_3	S_4
S_1	S_1S_3	S_1S_4
S_2	S_2S_3	S_2S_4

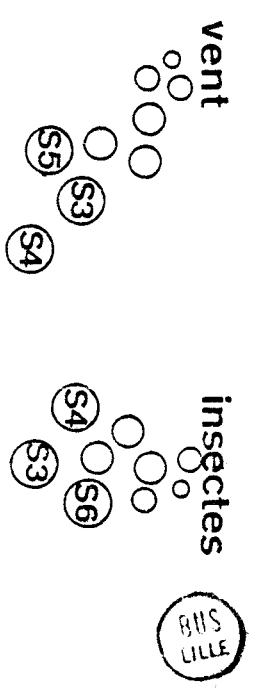
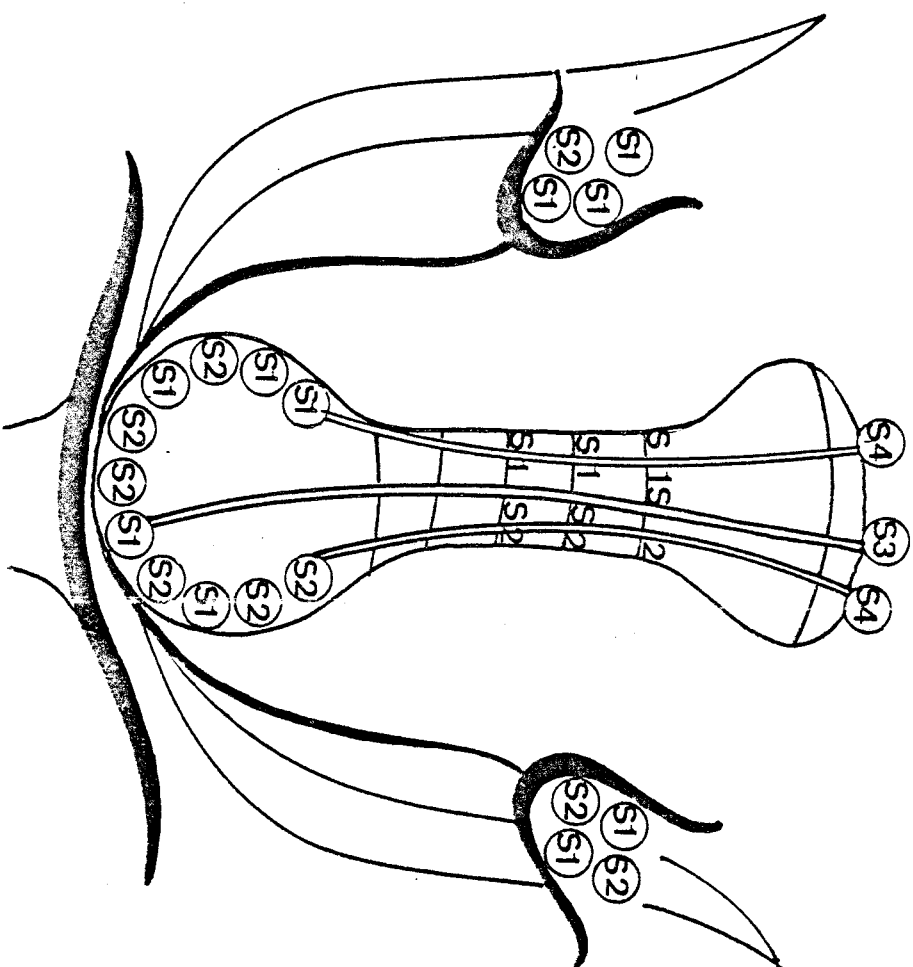
Dans la descendance, apparaissent 4 génotypes différents par les allèles S.

FIGURE 6 : AUTOINCOMPATIBILITÉ UNIFACTORIELLE GAMÉTOPHYTIQUE (D'APRÈS DE NETTANCOURT, 1972)

AUTOPOLLINISATION



XENOPOLLINISATION



Si la plante pollinisatrice S_1S_3 ne diffère de la plante réceptrice S_1S_2 que par le seul allèle S_3 , le schéma de la fécondation est le suivant :

♀ ♂	S_1	S_3
S_1	incomp.	S_1S_3
S_2	incomp.	S_2S_3

C'est le croisement demi-compatible ; le tube pollinique porteur de l'allèle S_1 ne peut traverser le style de la plante S_1S_2 , la descendance ne comporte que 2 génotypes.

Le nombre d'allèles S dans une même population peut être très grand ; chez *Oenothera organensis*, EMERSON (1939) en identifie 45 pour 500 plantes ; RILEY (1934) détecte 6 allèles S pour 4 individus chez *Nemesia strumosa* ; chez *Trifolium*, ATWOOD (1944) et WILLIAMS (1947) estiment qu'au moins 80 % des allèles S sont différents.

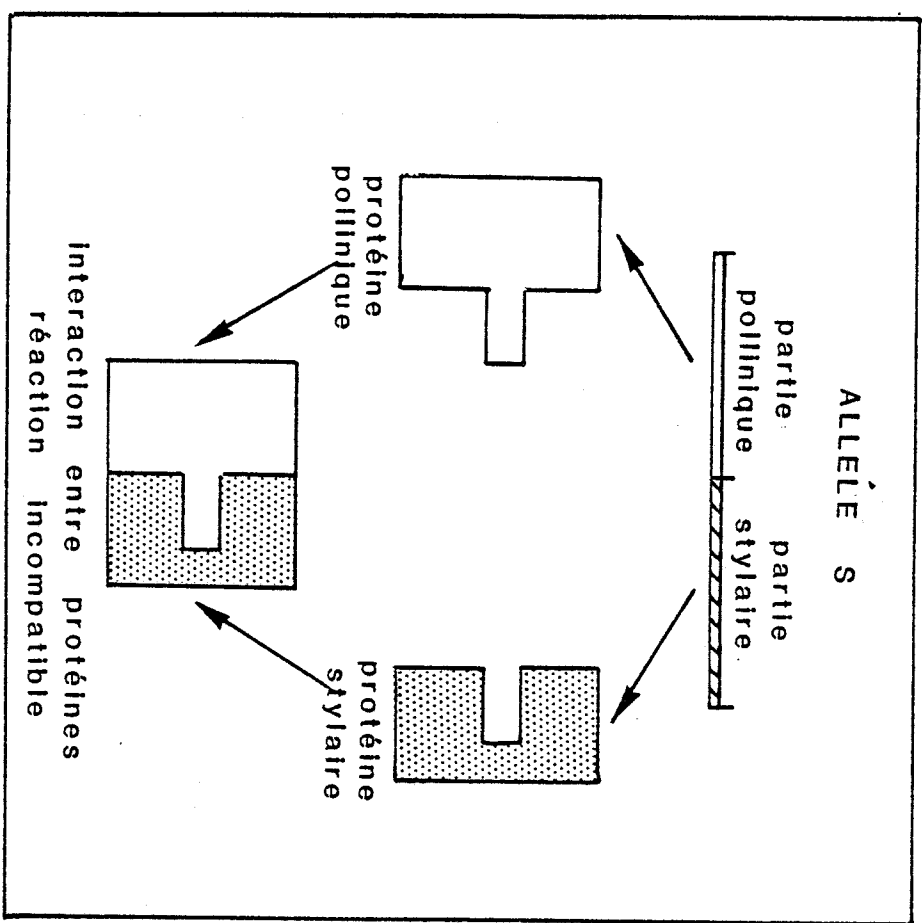
Structure du locus S dans le système monofactoriel gamétophytique : LEWIS (1949b, 1960) attribue au gène S du système AIG une structure tripartite, les 3 éléments étant liés entre eux (figure 7B).

Le premier élément, considéré comme la partie du locus S, individualise l'allèle qui le porte, et, contenant l'information génétique spécifique, empêche la croissance du tube pollinique dans le cas où un des éléments de spécificité identique est présent dans le style diploïde. Les deuxième et troisième segments ont été définis par LEWIS comme responsable de l'activité du pollen et du style ; ils sont comparables aux gènes régulateurs du modèle de JACOB et MONOD (1961). Dans les microspores le segment responsable de l'activité stylaire est inhibé et l'action sur le segment de spécificité est déclenchée par le segment responsable de l'activité du pollen. Dans le style ou dans le stigmate, le segment responsable de l'activité du pollen est inhibé et l'action sur le segment de spécificité est déclenchée par le segment responsable de l'activité stylaire.

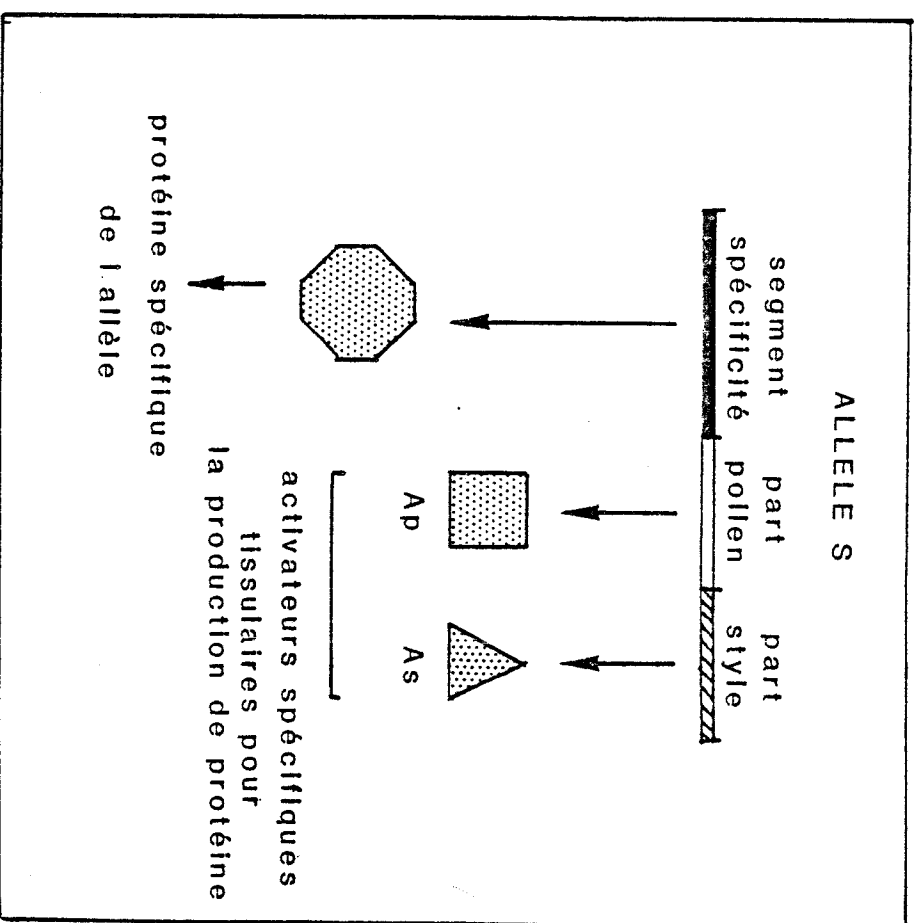
Des considérations génétiques, basées sur la possibilité d'une mutation indépendante des 2 segments d'activité, ainsi que sur la présence de relations

FIGURE 7 : STRUCTURE ET FONCTION DU GENE S SELON LEWIS

A : HYPOTHESE N° 1



B : HYPOTHESE N° 2



entre les segments d'activité mutés et le segment de spécificité, militent en faveur de ce modèle. Les 3 éléments du locus sont liés entre eux de façon très étroite car LEWIS n'a jamais obtenu de recombinants entre les segments d'activité et de spécificité ayant subi des délétions ou inactivés de façon permanente par des traitements mutagènes.

II - CONTROLE BIFACTORIEL A ALLELES MULTIPLES

Ce type d'AIG à 2 loci, découvert par LUNDQVIST (1956, 1961, 1962, 1965, 1968) chez les Graminées, semble être la règle générale dans cette famille. Les 2 loci impliqués, S et Z, sont indépendants et chacun d'entre eux possède des allèles multiples.

L'identité entre le pollen et le pistil pour un seul des 2 loci ne détermine pas l'incompatibilité : il y a rejet dans le seul cas où les 2 loci sont identiques dans le pollen haploïde et le tissu femelle diploïde (figure 8).

Les loci S et Z, bien qu'ayant probablement une origine commune, (LUNDQVIST, 1964) sont transmis de façon indépendante et ne présentent aucune liaison entre eux. Le nombre d'allèles S et Z dans une population peut être élevé. LUNDQVIST a trouvé 11 allèles S et 12 allèles Z dans une population de *Festuca pratensis* issue de 5 stations.

La structure des loci S et Z chez les Graminées est mal connue ; cependant, comme l'interaction de complémentarité entre les gènes S et Z peut être réalisée pour un nombre considérable d'allèles différents, il est probable que les relations entre les 2 loci sont simples c'est à dire qu'il ne doit pas exister une grande complexité structurale et dans l'organisation des gènes S et Z ; compte-tenu de leur origine commune, LUNDQVIST (1962) postule que les 2 loci sont probablement identiques, analogues à la structure classique du gène S.

III - CONTROLE BIFACTORIEL AVEC RELATIONS EPISTATIQUES

Découvert par PANDEY (1957) sur *Physalis ixocarpa*, il est caractérisé par 2 séries indépendantes d'allèles d'autoincompatibilité.

TABLEAU 8 : RELATIONS DE COMPATIBILITÉ DANS LES GRAMINÉES ENTRE DES INDIVIDUS HÉTÉROZYGOTES AUX LOCI S ET Z (D'APRÈS DE NETTANCOURT, 1977).

BUS LILLE

<p> $S_1 S_2 - Z_1 Z_2$ x $S_3 S_4 - Z_3 Z_4$ stigmate pollen gamètes zygotés </p> <p> $S_1 S_3 - Z_1 Z_3$ $S_1 S_4 - Z_1 Z_4$ $S_2 S_3 - Z_2 Z_3$ $S_2 S_4 - Z_2 Z_4$ </p>	<p> $S_1 S_2 - Z_1 Z_2$ x $S_1 S_3 - Z_1 Z_4$ stigmate pollen gamètes zygotés </p> <p> $S_1 S_1 - Z_1 Z_1$ $S_1 S_3 - Z_1 Z_3$ $S_1 S_4 - Z_1 Z_4$ $S_2 S_3 - Z_2 Z_3$ $S_2 S_4 - Z_2 Z_4$ </p>	<p> $S_1 S_2 - Z_1 Z_2$ x $S_1 S_2 - Z_1 Z_3$ stigmate pollen gamètes zygotés </p> <p> $S_1 S_1 - Z_1 Z_1$ $S_1 S_3 - Z_1 Z_3$ $S_1 S_4 - Z_1 Z_4$ $S_2 S_3 - Z_2 Z_3$ $S_2 S_4 - Z_2 Z_4$ </p>
<p> Aucune paire S-Z en commun (100% de compatibilité) </p>	<p> Une paire S-Z en commun (75% de compatibilité) </p>	<p> Deux paires S-Z en commun (50% de compatibilité) </p>

Il n'y a pas d'interaction compétitive dans le pollen, mais l'épistasie entre allèles des 2 loci du pollen et du style peut rendre le pollen incompatible même lorsqu'un seul de ses allèles est présent dans le style.

D'autres cas d'incompatibilité bifactorielle ont été élucidés par PANDEY (1962) et ABDALLA et HERMSEN (1971) chez les Solanacées ; PANDEY démontre que l'AI est sous la dépendance de 2 loci non liés : le locus S (ayant des allèles multiples normaux) et le locus R (avec 2 allèles mutants R_F et R_{ic}). Les allèles S sont épistatiques sur les allèles mutants R lorsqu'ils sont en situation hétérozygote. Dans l'état homozygote R_F et R_{ic} sont épistatiques sur S. Il y a dominance entre les allèles S et le cas est encore plus complexe car le système d'AI est en partie gamétophytique et en partie sporophytique. A l'intérieur du locus S, une unité (celle responsable de l'activité dans la terminologie de LEWIS) est sous contrôle sporophytique et est l'objet de relations interalléliques et intergéniques, tandis que la seconde, (le segment de spécificité de LEWIS) intervient de façon gamétophytique et, au moins dans le pollen, est indépendante de toute interaction. De la même façon, ABDALLA et HERMSEN (1971) ont trouvé chez *Solanum phureja* et *S. stenotomum* un mécanisme gamétophytique bifactoriel avec 2 loci (S et R), le locus S étant épistatique sur le locus R ; mais les relations de dominance ne sont pas apparentes entre les allèles S et R. Un allèle R (R_{gi}) possède la propriété, lorsqu'il se trouve en situation homozygote dans le pistil, d'empêcher toute fécondation ; ce mécanisme peut être assimilé à une stérilité femelle récessive. ABDALLA et HERMSEN ont vérifié leur hypothèse en analysant le résultat du croisement : $S_1 S_2 R R_{gi} \times S_3 S_4 R R_{gi}$. Ils trouvent effectivement 5 groupes intra-incompatibles intercompatibles avec la fréquence 4/3/3/3/3 avec stérilité femelle dans le groupe de fréquence 4 ($R_{gi} R_{gi}$).

IV - AIG TRIFACTORIELLE ET TETRAFACTORIELLE

Les travaux de LUNDQVIST et coll. (1973) ont mis en évidence 3 et 4 loci chez certaines espèces de Renonculacées et de Chenopodiacées.

Chez *Ranunculus acris*, plus de 16 groupes interincompatibles ségrègent en 3 familles différentes, ce qui implique qu'au minimum 3 loci S comportant des interactions complémentaires interviennent pour cette espèce ; chez *Beta vulgaris*, LUNDQVIST a pu démontrer, par des croisements appropriés, l'implication de 4 loci S complémentaires.

Les réponses négatives à l'autofécondation sont inscrites dans le patrimoine génique de façon plus ou moins complexe. Cependant, les réactions peuvent être modulées soit par des paramètres physiologiques, soit par l'environnement génétique.

F. MODIFICATION DE LA RÉPONSE INCOMPATIBLE

Ces modifications peuvent être temporaires, non transmissibles, lorsqu'elles résultent d'effets physiologiques sur diverses structures participant, directement ou non, à la réaction d'incompatibilité ; d'autres changements sont génétiques et se manifestent par une grande diversité d'effets, allant de la suppression de l'autoincompatibilité à une augmentation des séries alléliques, ou à l'apparition de nouvelles relations entre le pollen et le pistil.

I - METHODES PHYSIOLOGIQUES

De nombreux facteurs peuvent altérer la réaction de blocage ; ces facteurs peuvent intervenir sur les microspores ou sur le pistil ou encore sur le complexe pollen-pistil au cours de la phase de reconnaissance ou de rejet. Ces effets peuvent correspondre à :

- une inhibition de l'action du gène S ;
- une activation des produits du gène S ;
- la transmission d'un stimulus de croissance au tube pollinique incompatible ;
- une diminution du temps nécessaire à la croissance très lente de tubes incompatibles pour leur permettre d'atteindre l'ovaire avant l'abscission florale ou la mobilisation de l'ovule par le tube pollinique compatible.

a) Effets de l'âge.

Le phénotype incompatible du pollen et du pistil s'exprimant à la maturité florale, plusieurs chercheurs ont tenté de surmonter la barrière à la fécondation en utilisant des organes floraux immatures (bourgeons floraux), des fleurs âgées ou du pollen âgé au niveau desquels le mécanisme

responsable du phénomène est moins efficace. Pour la même raison, des pollinisations en fin de période de floraison ont été tentées.

1-pollinisation au stade du bouton floral : "Bud-pollination" : Dans les styles immatures, le mécanisme d'inhibition de la croissance des tubes polliniques n'est pas total ; le degré d'inhibition augmente avec la maturation. La méthode de pollinisation au stade du bouton floral a été employée avec succès, sur des systèmes gamétophytiques et sporophytiques (YASUDA, 1934 ; ATTIA, 1950 ; LEWIS, 1951 ; PANDEY, 1959 ; ASCHER et PELOQUIN, 1966 ; BREDEMEIJER, 1976) chez *Brassica*, *Petunia*, *Nicotiana*.

SHIVANNA et RANGASWAMY (1969) ont mis en évidence que le pourcentage de réussite est amélioré si le stigmate récepteur est enduit d'exsudat stigmatique provenant d'une fleur mature : celui-ci renforce l'adhésivité du pollen sur le jeune stigmate. Il existe une corrélation entre l'âge du bourgeon floral et le degré d'inhibition du tube pollinique (LINSKENS, 1964).

Dans le cas de l'AIS, une autre méthode consiste à prélever des jeunes microspores qui n'ont pas encore reçu de substance d'incompatibilité provenant du tapis, et de les transférer soit sur un milieu de culture artificiel soit sur des anthères possédant des génotypes S différents (De NETTANCOURT, 1977).

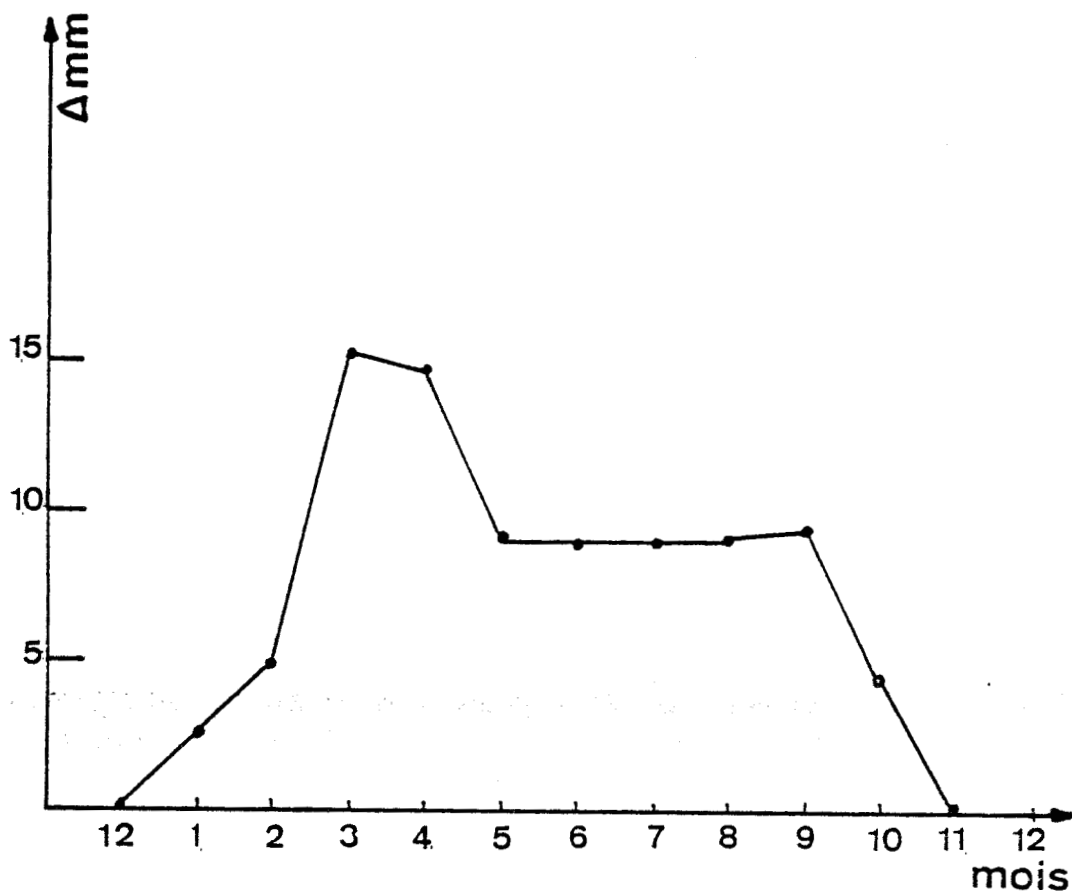
2-pollinisation de fleurs âgées : KAKIZAKI (1930), ASCHER et PELOQUIN (1966) travaillant respectivement sur *Brassica* et *Lilium* ont montré que des pistils âgés autopollinisés donnent un certain nombre de graines "illégitimes" : l'âge induirait donc, chez ces espèces, une perte progressive de la capacité de produire ou de stocker des "substances" d'incompatibilité actives.

3-influence de l'âge du pollen : SHIVANNA et RANGASWAMY (1969) ont démontré que l'âge du pollen ne modifie pas la réaction d'inhibition (chez *Petunia axillaris*).

4-autopollinisation en fin de saison : Pour de nombreuses plantes autoincompatibles, le degré d'inhibition varie avec le cycle biologique. Ainsi la barrière à la fécondation peut être levée en fin de saison (EAST, 1934, sur *Nicotiana glauca* et *N. sanderae* ; YASUDA, 1934, sur *Petunia violacea* ; PANDEY, 1960, sur *Abutilon hybridum*). LINSKENS (1972) a établi une relation entre l'intensité de la réaction d'incompatibilité et la saison de pollinisation chez *Petunia hybrida* (figure 9).

FIGURE 9 :

EVOLUTION DE LA REACTION D'INCOMPATIBILITE CHEZ *PETUNIA HYBRIDA*
EN FONCTION DES SAISONS (LINSKENS, 1972)



La courbe reflète la différence arithmétique entre la longueur du tube pollinique après 24 heures de xénopollinisation et d'auto-pollinisation.

Ces résultats traduisent une diminution de la capacité à produire les éléments nécessaires à la reconnaissance ou à la réaction de rejet par la plante autopolinisée.

b) Chocs thermiques.

De nombreux auteurs ont démontré que des chocs thermiques (pour des températures variant de 32 à 60°C), permettaient de lever l'AI. Cette méthode s'applique essentiellement aux espèces AIG monofactorielles : chez *Malus* et *Pyrus* (LEWIS, 1942 ; MODLIBOWSKA, 1945) ; *Oenothera* (LEWIS, 1942 ; HECHT, 1964 et LINSKENS et KROH, 1967) ; *Prunus* (LEWIS, 1942) ; *Trifolium* (LEFFEL, 1963 ; TOWNSEND, 1965, 1968, 1971 ; KENDAL et TAYLOR, 1969) ; *Primula* (LEWIS, 1942) ; *Lilium* (ASCHER et PELOQUIN, 1966) ; *Lycopersicum* (HOFFMANN, 1966 ; De NETTANCOURT et coll., 1971 ; HOGENBOOM, 1972) et *Secale* (WRICKE, 1974).

La technique consiste à immerger le style dans l'eau chaude ou à cultiver, pendant certains stades de végétation, les plantes dans des pièces portées à une température relativement élevée.

Il apparaît que le site responsable est localisé dans le style et que la période sensible se situe aux deux premiers jours suivant la pollinisation. L'efficacité du traitement dépend du génotype de la plante et de la thermosensibilité spécifique de chaque gène. LEWIS (1942) a mis en évidence la sensibilité à la température du locus S chez *Oenothera organensis* : la température aurait une influence sur la synthèse d'une substance responsable de l'installation de l'AI ce qui implique probablement une inactivation enzymatique.

c) Utilisation d'hormones et d'inhibiteurs.

L'application d'inhibiteurs de l'abscission florale tels que l'acide naphthyl-acétique (ANA) ou l'acide indolyl acétique (AIA), sur le calice de la fleur permet aux tubes incompatibles à croissance plus lente, d'atteindre l'ovaire. Ainsi, HENNY et ASCHER (1973), après des injections d'auxines dans les styles de *Lilium*, signalent que les tubes polliniques incompatibles ne sont pas affectés mais que l'injection d'AIA à 1000 ppm inhibe la croissance des tubes polliniques compatibles.

D'autres substances, inhibitrices de la synthèse d'ARN ou de protéines ont été utilisées : ainsi, SARFATTI et coll. (1974) ont démontré que l'actinomycine D inhibe partiellement l'AI chez *Lycopersicum peruvianum*.

ASCHER (1971), démontre chez *Lilium*, la nécessité de la synthèse d'ARN pour l'établissement du phénotype incompatible dans le style en injectant de la 6-méthyl purine (inhibiteur de la synthèse d'ARN) avant la pollinisation.

ASCHER (1974) a également mis en évidence le rôle de la puromycine (inhibiteur protéique) qui, appliquée dans le style de *Lilium longiflorum* au stade du bourgeon, permet la croissance du tube pollinique incompatible. La substance d'incompatibilité stylaire, chez *Lilium longiflorum*, pourrait être de l'ARN à durée de vie courte ; le traitement à la puromycine, appliqué avant l'anthèse bloquerait la synthèse d'ARN polymérase.

Pour mettre en évidence l'implication de systèmes enzymatiques dans le mécanisme AI, HODGDON et HECHT (1975) ont testé l'effet inhibiteur du PCMB (parachloromercuribenzoate) sur la croissance du tube pollinique après pollinisations incompatibles chez *Oenothera organensis*. Le PCMB provoque effectivement une inactivation des systèmes d'AI mais affecte également, lorsqu'il est associé à un agent mouillant, la régularité de la germination du pollen. HODGDON et HECHT en déduisent qu'un enzyme à radical thiol joue certainement un rôle dans le mécanisme d'autoincompatibilité.

d) Action de l'anhydride carbonique.

NAKANISHI et coll. (1969), NAKANISHI et HINATA (1973) ont démontré que la réaction d'autoincompatibilité pouvait être éliminée chez *Brassica* en traitant les fleurs avec CO_2 .

e) Effet des radiations ionisantes.

Les radiations ionisantes peuvent rompre la barrière à l'autofécondation lorsqu'elles sont utilisées dans les conditions ci-après :

1-exposition chronique à doses faibles : Des faibles doses de rayons gamma appliquées de façon continue au cours de la floraison autorisent l'autofécondation (chez *Lycopersicon peruvianum* (De NETTANCOURT et ECOCHART, 1968) et chez *Nicotiana glauca* (VAN GASTEL et De NETTANCOURT, 1974)).

Ce résultat est dû à deux actions concomitantes : à l'inhibition de l'abscission florale qui intervient normalement quelques jours après la pollinisation incompatible et à l'augmentation de la capacité du tube pollinique incompatible à surmonter les barrières d'AI.

Le caractère de compatibilité obtenu ne s'observe jamais à la génération suivante. DEVREUX et coll. (1975) l'ont également mis en évidence chez *Oenothera* après exposition aux radiations ionisantes au cours de la microsporogénèse.

2-irradiation des styles par des fortes doses : LINSKENS et coll. (1960) ont démontré que l'irradiation à haute dose des styles de *Petunia* peut atténuer la réaction de rejet : une dose de rayons X de 2 000 rads appliquée sur le style immédiatement après autopollinisation induit la formation de 50 % de graines ; lorsque la pollinisation est réalisée 24 heures après l'irradiation, l'effet obtenu est très faible ; il n'y a aucune fécondation lorsque la pollinisation a lieu 20 heures avant l'irradiation. La dose efficace, trop faible pour être à l'origine de la destruction d'une substance d'incompatibilité (VASILEV, 1962) suggère l'activation temporaire d'un gène dans le style.

Des résultats analogues ont été observés chez *Lilium longiflorum* par HOPPER et PELOQUIN (1968), mais avec des doses plus élevées (de 6 000 à 24 000 rads). Ces auteurs ont souligné le fait que les fécondations obtenues s'apparentent à celles observées par inactivation thermique et donc que l'effet des radiations est assimilable à une inactivation enzymatique.

3-stimulation par du pollen compatible tué : Un effet stimulateur peut être induit en mélangeant du pollen compatible tué par irradiation à du pollen incompatible normal (De NETTANCOURT et GRANT, 1963 ; MIRI et BUBAR, 1966 ; OPEKE et JACOB, 1969 ; KNOX et coll. (1972).

Cet effet s'exerce à deux niveaux : d'une part, il évite la fécondation par le pollen compatible et donc la mobilisation des ovules avant que les tubes polliniques incompatibles n'atteignent l'ovaire ; d'autre part, le pollen compatible "désactivé" transfère des substances sur les grains de pollen incompatibles. La nature de cette stimulation reste inconnue : en effet, la paroi du pollen stimulateur fournirait, au moins chez les espèces sporophytiques, les protéines nécessaires à la mobilisation des substances incompatibles par le pollen incompatible, ou transfère sur le pollen incompatible, des substances de croissance qui ne sont normalement pas formées ou qui sont neutralisées. KNOX et coll. notent que cette activation concerne essentiellement les systèmes sporophytiques.

f) Stimulation électrique.

ROGGEN et coll. (1972) ont montré que l'application d'un potentiel électrique, chez *Brassica oleraceae*, permet de lever partiellement la

barrière d'AI (utilisation d'une d.d.p. de 100 volts entre le pollen et le stigmate).

Cet effet s'explique de 3 façons :

- 1) la d.d.p. appliquée induit une forte adhérence des grains de pollen incompatibles sur le stigmate ;
- 2) il se produit une modification de la structure du stigmate ;
- 3) la perméabilité des membranes cellulaires est modifiée.

Par ailleurs, LINSKENS et SPANJERS (1973) ont mis en évidence que la phase d'information en relation dans le style avec la pollinisation et l'activation de l'ovule, sont de nature électrique ; il est donc légitime de penser que la stimulation électrique intervient davantage sur l'activation ovulaire que sur l'adhésivité du pollen incompatible et sa germination.

g) Expériences de greffe.

L'incompatibilité peut être éliminée ou affaiblie par des greffes : les travaux de DENWARD (1963) sur *Trifolium pratense* ont mis en évidence que des greffes peuvent lever la barrière d'incompatibilité.

KIVILAAN et CHANG (1963) ont montré que la longueur du tube pollinique dans le style incompatible est plus importante lorsque l'on procède à une greffe hétérologue (chez *Oenothera organensis*).

Une greffe réalisée au niveau du pistil chez *Oenothera* permet aux tubes polliniques compatibles du greffon (stigmate et région stigmatique du style) de traverser la zone de jonction et de poursuivre leur croissance dans la partie incompatible (HECHT, 1960, 1964).

h) Mutilations et injections.

L'ablation du stigmate permet d'obtenir un certain taux d'auto-fécondation ; ROGGEN et VAN DIJK (1972) ont éliminé la réaction AI en mutilant le stigmate de *Brassica oleraceae* ; dans ce cas, le stigmate, ou au moins la pellicule stigmatique, porte les fonctions de site de reconnaissance de l'AI et de site d'activation pour la pénétration du xénotube pollinique.

D'autres expériences ont consisté à remplir le canal styloïde, lorsqu'il existe, avec de l'exsudat stigmatique provenant de fleurs porteuses des mêmes allèles d'incompatibilité (ASCHER et DREWLOW, 1971 sur *Lilium longiflorum*). Après pollinisations compatible et incompatible, les auteurs notent que l'exsudat stigmatique, lorsqu'il est injecté 24 heures avant la pollinisation,

favorise la croissance des tubes polliniques mais ne modifie pas la réaction d'incompatibilité car l'inhibition de croissance a quand même lieu après autopolinisation.

Des injections de calcium, d'extraits stylaires, de $KMnO_4$, d'eau oxygénée, d'acide borique ont également été effectuées mais les résultats obtenus ne sont pas concluants (LINSKENS, 1972).

i) Fécondation *in vitro*.

Il est possible d'obtenir la fécondation *in vitro* en mettant directement en contact les ovules et les grains de pollen (KANTA et coll., 1962 ; MAHESHWARI et KANTA, 1964 ; RANGASWAMY et SHIVANNA, 1967, 1971, 1972) ; la syngamie a lieu indépendamment du caractère de compatibilité des organes floraux. Cette technique peut d'ailleurs être utilisée pour réaliser des croisements interspécifiques (ZENKTELER, 1967, 1970, 1973).

II - METHODES GENETIQUES

Trois types de modifications génétiques peuvent avoir une influence sur l'AI :

- a) la polyploïdisation ;
- b) la mutation du ou des gènes d'incompatibilité ;
- c) la modification du contexte génétique.

a) La polyploïdisation.

Les dicotylédones tétraploïdes, possédant le système AIG, présentent le phénotype autocompatible (LEWIS, 1943, 1947, 1949a ; ATWOOD et BREWBAKER, 1953 ; BREWBAKER, 1954, 1958 ; SAMPSON, 1960 ; ANNERSTEDT et LUNDQVIST, 1967).

Cette propriété ne dépend pas du pistil qui garde son pouvoir inhibiteur vis-à-vis des tubes polliniques incompatibles mais provient d'une incapacité du pollen diploïde, issu d'une plante tétraploïde, à présenter le phénotype incompatible.

LEWIS (1947, 1949a), travaillant sur *Oenothera organensis*, a démontré que la production du pollen compatible par les tétraploïdes est limitée aux plantes hétérozygotes pour le gène S (SaSa SbSb) ; seuls les grains de pollen porteurs de 2 allèles différents (SaSb) sont compatibles ; cependant,

cette hétérozygotie pour le gène S n'est pas toujours la seule condition à la compatibilité ; LEWIS (1947) a démontré qu'il pouvait y avoir des relations de dominance entre allèles S.

Enfin, il faut signaler que la faculté, pour un pollen hétéro-allélique, de devenir compatible ne dépend pas toujours de la similitude entre les 2 allèles S mais aussi de l'environnement génétique de la plante tétraploïde.

Par contre, chez les monocotylédones à système AIG, la ploïdie n'a pas d'effet sur la compatibilité ; ANNERSTEDT et LUNDQVIST (1967) ont montré sur *Tradescantia paludosa* qu'aucune des combinaisons entre les 12 paires d'allèles S d'un pollen diploïde ne présente d'interaction compétitive.

b) L'autoincompatibilité chez les triploïdes et les trisomiques.

Lorsqu'un croisement est effectué entre un tétraploïde hétérozygote autocompatible ($S_1S_1 S_2S_2$) avec un diploïde autoincompatible (S_3S_4) on obtient les triploïdes suivants, hétérozygotes au locus S :

($S_1S_2S_3$, $S_1S_2S_4$, $S_1S_1S_3$, $S_1S_1S_4$, $S_2S_2S_3$ ou $S_2S_2S_4$) ;

lorsqu'il n'y a pas de létalité pollinique, il existe un certain taux de pollen compatible hétéroallélique. Les résultats montrent que les triploïdes ne produisent pas de pollen compatible (expériences faites sur *Nicotiana glauca*). De plus, il n'y a pas de production de pollen compatible dans les lignées aneuploïdes qui apparaissent trisomiques ($S_1S_2S_3$) pour le gène d'autoincompatibilité (VAN GASTEL et CARLUCCIO, 1974).

c) Mutations au locus S.

1-les mutations dans les systèmes AIS : KAKIZAKI (1930) a trouvé chez *Brassica oleracea* (variété *capitata*) une plante autocompatible dont la ségrégation donne 50 % de compatible et 50 % d'incompatible. Des cas similaires ont été signalés par THOMPSON et TAYLOR (1971), et par THOMPSON (1972). D'après ces auteurs, il n'y aurait pas une véritable mutation au locus S mais les phénotypes trouvés correspondent au cas où les 2 allèles S produisent trop peu de "substance d'incompatibilité" pour que leur association induise une réaction de rejet.

2-mutations dans le système AIG monofactoriel : On distingue 4 grandes catégories de mutations :

1) celles qui associent la compatibilité du pollen à la présence d'un fragment centrique libre (BREWBAKER et NATARAJAN, 1960 ; PANDEY, 1965, 1967b, 1969) ;

2) celles qui produisent un pollen compatible, sans relation avec la présence d'un fragment centrique libre ; c'est le cas chez *Oenothera*, *Prunus*, *Trifolium* ;

3) les mutations induisant la compatibilité du style ; elles sont rares mais ont été trouvées chez *Oenothera* et *Nicotiana* (LEWIS et CROWE, 1954 ; PANDEY, 1956 ; VAN GASTEL, 1972) ;

4) les mutations qui permettent à une même plante de produire du pollen compatible et d'accepter du pollen incompatible.

3-la modification du contexte génétique : Il peut y avoir rupture de l'AI après mutation sur d'autres loci que ceux du gène S. La vigueur et la persistance du caractère d'AI varient d'un cas à l'autre et peuvent être masquées par des phénomènes de stérilité ou de croissance déficiente. Dans tous les cas, ce phénomène est attribué à des modifications de l'environnement génétique du gène S qui cesse de fonctionner dans le pollen ou le pistil ou qui diminue fortement son activité.

TOWNSEND (1969) a trouvé chez *Trifolium hybridum*, l'allèle A_1 d'un locus A qui, lorsqu'il se trouve en position hétérozygote (A_1A_2) et dans certaines conditions d'environnement génétique, supprime l'action des allèles S.

4-les agents mutagènes : Les agents mutagènes classiques (rayons X, neutrons rapides, rayons UV, Ozone) peuvent modifier la réaction mais n'ont pas la propriété d'induire de nouveaux allèles S.

De tels nouveaux allèles S peuvent cependant apparaître spontanément avec une fréquence élevée, au moins chez quelques espèces. Les allèles S obtenus ont tellement de points communs qu'il semble qu'ils ne diffèrent entre eux que par des simples substitutions de nucléotides.

G. ASPECTS PHYSIOLOGIQUES ET BIOCHIMIQUES DE LA RÉACTION INCOMPATIBLE

I - LE GRAIN DE POLLEN ET LA REACTION D'AUTOINCOMPATIBILITE

Chez les Angiospermes, le grain de pollen (gamétophyte mâle) est adapté au transport des gamètes ; la protection mécanique est assurée par une couche externe résistante, composée de sporopollénine. Cette couche, l'exine, joue également un rôle dans le mode de dispersion du pollen : à une pollinisation éolienne est associée une surface lisse et l'absence de matériau adhésif ; une zoochorie est en relation avec une surface rugueuse et un revêtement visqueux.

La paroi des grains de pollen participe également au stockage, au transport et à l'émission des substances impliquées dans les réactions de reconnaissance qui vont déterminer l'acceptation ou le rejet incompatible.

a) Cytologie du pollen et incompatibilité.

Nous avons déjà signalé les corrélations qui existent entre le type d'autoincompatibilité (gamétophytique ou sporophytique) et les caractéristiques caryologiques du grain de pollen (binucléé ou trinucléé). Le pollen binucléé est lié au système gamétophytique ; il comporte un noyau végétatif et un noyau reproducteur ; celui-ci se divise au cours de la croissance du tube pollinique et donne deux gamètes mâles.

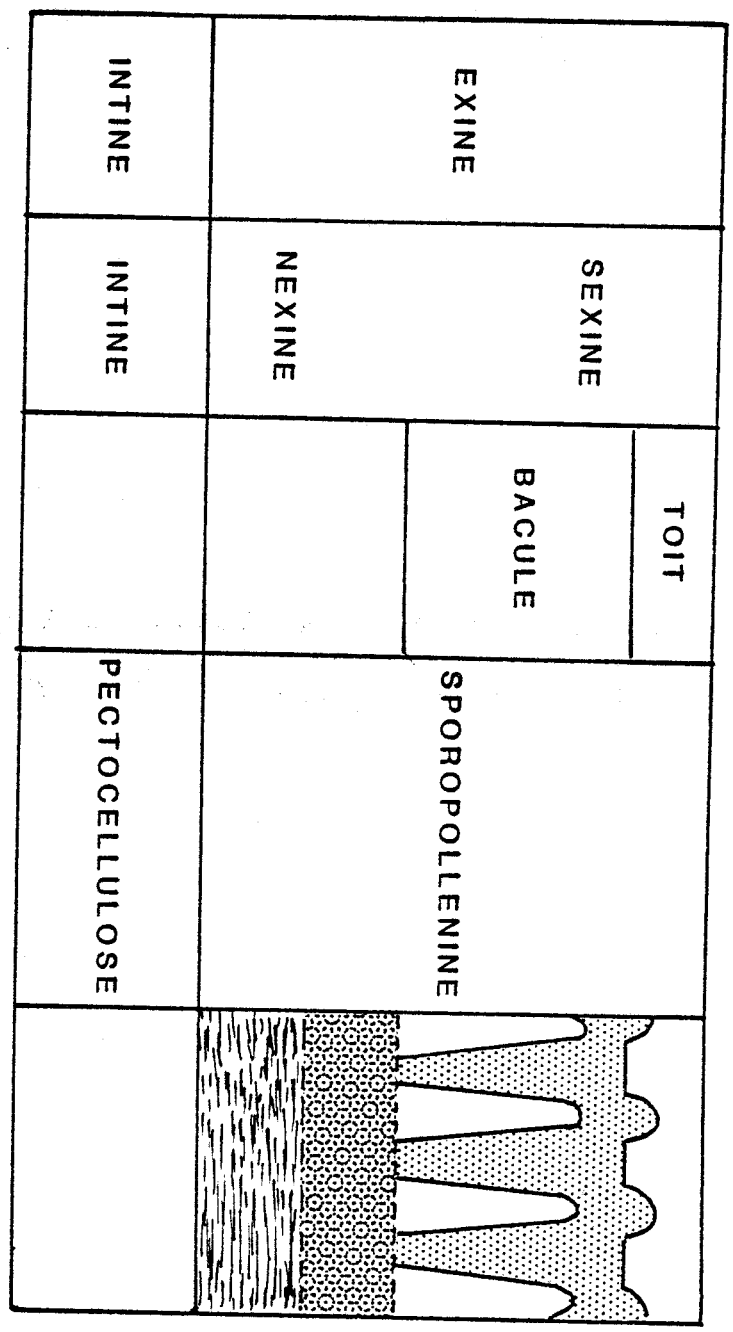
Dans le cas du pollen trinucléé, la division du noyau reproducteur a lieu avant que le pollen ne soit fixé sur le stigmate ; il possède donc un noyau végétatif et 2 noyaux reproducteurs.

b) Structure de la paroi du pollen.

Dans le système AIS, l'inhibition de la germination du grain de pollen est très rapide : elle se fait dès le contact de la paroi du pollen avec la surface stigmatique ; il est évident, au moins dans les systèmes AIS, que cette paroi a un rôle important à jouer dans l'installation de la réaction incompatible. La structure de la paroi du pollen arrivé à maturité, chez les Angiospermes, est présentée figure 10.

8

FIGURE 10 : STRUCTURE DE LA PAROI DU GRAIN DE POLLEN



AUS. LILLE

Entre l'exine et l'intine, il existerait une troisième couche intermédiaire ou médine (SAAD, 1963) : celle-ci, hygroscopique et de texture lamellaire ou globulaire, contribuerait à la protection des zones aperturales, permettrait les modifications de taille du grain de pollen et serait à l'origine de l'élongation du tube pollinique.

1- *l'exine ou sporoderme* : L'exine est principalement constituée de sporopollénine dont la composition chimique n'est pas entièrement élucidée : de nature lipidique, c'est un polymère oxydé de caroténoïdes et d'esters de caroténoïdes, particulièrement résistant aux dégradations acides ou enzymatiques (BROOKS et SHAW, 1968 ; SHAW, 1971 ; HESLOP-HARRISON, 1975a).

A maturité, l'exine présente un aspect stratifié : la partie interne ou nexine, non sculptée et la sexine externe, sculptée (HESLOP-HARRISON, 1975a). Celle-ci est composée de colonnes radiales provenant de la nexine. Les colonnes ou bacules sont disposées en général selon un arrangement commun aux mono et aux dicotylédones. S'il n'y a pas de toit (tectum), les cavités délimitées par les bacules sont ouvertes vers l'extérieur. S'il y a un tectum, celui-ci est invariablement interrompu par des perforations (micropores) permettant ainsi la communication avec l'extérieur (figure 10).

La structure de l'exine est adaptée au transport de produits d'importance fondamentale pour la réaction d'incompatibilité (HESLOP-HARRISON, 1975a) ; ainsi, par exemple, l'assise nourricière des microspores (tapis) synthétise des protéines qui seront transférées au niveau de l'exine ; de même, des lipides sont synthétisés dans le tapis, en grande quantité à la fin de la maturation des microspores et fixés à la surface du pollen ; c'est également le cas pour des substances caroténoïdes responsables de la couleur du pollen (HESLOP-HARRISON, 1968) ; l'activité enzymatique de l'exine est très faible (HESLOP-HARRISON et coll., 1973).

2- *l'intine* : La couche interne est constituée par dépôts successifs pendant la formation de l'exine ; il y a accumulation de matériel amorphe de nature cellulosique, qui va être incorporée dans les couches de l'intine.

Il faut également remarquer l'incorporation de protéines (KNOX, 1971 ; KNOX et HESLOP-HARRISON, 1970) et en particulier d'hydrolases acides ; cependant, les enzymes ne représentent qu'une faible partie de ces protéines.

En conclusion, on peut constater qu'à maturité, le grain de pollen porte dans sa paroi des fractions dérivant du gamétophyte haploïde et du sporophyte

diploïde. La structure de la paroi est adaptée (cavités délimitées par des bacules) au stockage de ces substances et à leur libération.

c) Emission de protéines issues du pollen.

A la fin de sa maturation, le grain de pollen se dessèche pour ne plus contenir finalement que 15 % d'eau ; sa surface est le plus souvent recouverte de substances de nature lipidique (HESLOP-HARRISON, 1968 ; HESLOP-HARRISON et coll., 1973).

La réhydratation du pollen débute immédiatement après sa fixation sur la papille stigmatique ; vient ensuite une étape de reconnaissance déterminante pour la germination et la croissance du tube pollinique ; l'hydratation des grains s'accompagne de la libération de fractions protéiques (STANLEY et LINSKENS, 1965 ; MAKINEN et BREWBAKER, 1967) provenant de la paroi du grain de pollen.

1-mise en évidence des émissions protéiques :

.diffusion en milieu liquide : les techniques les plus simples et les plus anciennes reposent sur la diffusion en milieu liquide ; le pollen est immergé dans une solution tamponnée ; les exsudats font l'objet de dosage protéique (STANLEY et LINSKENS, 1965) ; ils peuvent également servir à la préparation d'antisérums contre les protéines des grains de pollen de génotype connu (LEWIS, 1952 ; LEWIS et coll., 1967 ; MAKINEN et LEWIS, 1962).

.observation microscopique : elle permet, après coloration (KNOX et HESLOP-HARRISON, 1969) ou en immunofluorescence (KNOX et coll., 1972) en microscopie optique, ou en microscopie électronique, de mettre en évidence et de localiser précisément ces émissions.

.empreinte pollinique : les grains de pollen sont mis en contact avec des films d'agarose humide où ils s'hydratent comme sur un stigmate ; les protéines du grain de pollen diffusent dans le film d'agarose où elles sont localisées par colorations spécifiques ou par immunofluorescence (KNOX, 1971).

.empreinte pollinique sur des coupes de pollen : les coupes de grains de pollen faites à basse température, sont mises en contact de films d'agarose humides où se fait l'émission de protéines (KNOX et HESLOP-HARRISON, 1970). L'emploi de ces diverses techniques permet de caractériser précisément les protéines émises par les grains de pollen au moment de l'humidification et de distinguer entre deux types d'émissions : les exsudats à court et à long terme.

2-les exsudats protéiques : STANLEY et LINSKENS (1965) ont constaté que la diffusion des protéines se fait en deux étapes : une, rapide, qui débute dès l'hydratation du pollen et qui se poursuit à vitesse décroissante pendant 30 minutes et une deuxième après un temps d'une heure.

De même, la technique des empreintes polliniques permet de différencier deux types d'exsudats et ceci quelle que soit l'espèce étudiée ou le type de pollen :

- les exsudats à court terme correspondant aux protéines diffusant rapidement (entre 1 à 30 secondes) : elles sont contenues dans les cavités de l'exine et d'origine sporophytique ;

- les exsudats à long terme correspondant aux protéines diffusant plus lentement : elles proviennent des sites de l'intine et ont une origine gamétophytique.

d) Localisation et caractérisation des protéines émises.

1-les protéines de l'exine : Elles sont contenues dans les cavités de la couche externe sculptée (sexine, voir figure 10) ; la morphologie de cette couche varie beaucoup mais, d'une manière générale, la présence de bacules confère à cette couche un aspect réticulé. Il existe donc un volume plus ou moins grand pouvant recevoir des matériaux du tissu nourricier de l'anthère pendant la phase finale de maturation du pollen (HESLOP-HARRISON, 1968, 1973). Ces protéines sont le support d'activités enzymatiques : KNOX (1971) a identifié des amylases et des protéases ainsi que des déshydrogénases ; TSINGER et PETROVSKAYA-BARANOVA (1961), LEWIS et coll. (1967) ont mis en évidence des oxydases ; d'autres auteurs ont identifié des hydrolases ainsi que des allergènes acides et basiques. KNOX et coll. (1975) ont isolé 6 à 7 fractions protéiques provenant de l'exine par électrofocalisation sur gel de polyacrylamide. Ces protéines ont un poids moléculaire compris entre 10 000 et 45 000 daltons.

2-les protéines de l'intine : Leur analyse est plus facile en raison de leur diffusion lente. Leur localisation et leur caractérisation ont été réalisées grâce à l'emploi de techniques cytochimiques et d'immunofluorescence (KNOX et HESLOP-HARRISON, 1971b ; KNOX et coll., 1972).

Localisation : les zones protéiques, observées en microscopie électronique, au niveau des ouvertures de l'intine, correspondent aux activités enzymatiques mises en évidence par ailleurs par des méthodes cytochimiques au microscope optique. La localisation des enzymes en fonction des espèces et du type de pollen est présentée dans le tableau 11.

TABLEAU 11 : LOCALISATION DES ENZYMES DANS LES SITES DE L'INTINE
ET DE L'EXINE DES GRAINS DE POLLEN

Enzymes	Intine	Exine	Références
<i>Deshydrogénases</i>			
NADH et deshydrogénase succinique	-	+	TSINGER et PETROVSKAYA-BARANOVA (1961) KNOX (1971)
<i>Oxydases</i>			
Cytochrome oxydase	-	+	TSINGER et PETROVSKAYA-BARANOVA (1961)
<i>Transférases</i>			
Phosphorylase		?	MARTIN (1968)
Ribonucléase	+	-	KNOX et HESLOP-HARRISON (1970)
<i>Hydrolases</i>			
Phosphatase acide	+	-	TSINGER et PETROVSKAYA-BARANOVA (1961) KNOX et HESLOP-HARRISON (1969, 1970)
Amylase	+	+	KNOX et HESLOP-HARRISON (1970) ; KNOX (1971)
Cellulase (β -1,4-glucanase)		?	STANLEY et LINSKENS (1965)
Estérase	+	+	KNOX et HESLOP-HARRISON (1969, 1970)
Invertase (β -fructofuranosidase)		?	DICKINSON (1965)
Polygalacturonase (pectinase)		?	STANLEY et THOMAS (1967)
Protéase	+	+	KNOX et HESLOP-HARRISON (1970) ; KNOX (1971)



Les protéines sont concentrées au niveau des orifices de germination ; lorsqu'il n'y a pas d'ouverture individualisée, l'émission protéique se fait à partir de toute la surface du grain de pollen.

Cette localisation des protéines de l'intine explique la lenteur de leur émission : il y a nécessité d'une réhydratation totale de l'intine avant que ne commence la diffusion.

.caractérisation : elle a été réalisée en particulier par TSINGER et PETROVSKAYA-BARANOVA (1961). KNOX et HESLOP-HARRISON (1969, 1970) et KNOX (1971a) ont démontré l'existence d'enzymes hydrolytiques en provenance de l'intine, chez plus de 60 espèces.

Les enzymes de l'intine peuvent être détectés à différents stades de la maturation du grain de pollen et en particulier au cours de la période qui suit l'éclatement des tétrades méiotiques (KNOX et coll., 1975).

Le ruban de protéines est inséré dans les lamelles celluloses au fur et à mesure que la paroi s'épaissit (KNOX et HESLOP-HARRISON, 1970). Les enzymes sont donc synthétisés par la cellule haploïde et leur origine est bien gamétophytique.

La présence d'une protéine ayant une activité antigénique identique à celle des IgE est également démontrée dans l'intine (HOWLETT et coll., 1973 ; KNOX, 1971a). L'antigène est présent sous des formes immunologiquement similaires mais possède des points isoélectriques différents.

3-comparaison des diverses fractions : Les méthodes cytochimiques ont mis en évidence des différences fonctionnelles caractéristiques des protéines d'origine gamétophytique et sporophytique stockées dans l'intine et dans l'exine.

Les déshydrogénases et les oxydases sont localisées au niveau de l'exine ; les phosphatases acides ou alcalines, les phosphorylases et ribonucléases sont, par contre, situées dans l'intine.

Cependant, un grand nombre d'hydrolases se retrouvent dans ces deux sites ; il paraît évident que ces enzymes, dont les activités sont semblables, mais l'origine différente, sont des isozymes.

BREWBAKER (1971) a étudié les variations des isozymes estérases du pollen, des anthères, des styles et des ovules d'une même plante ; certains coenzymes sont communs aux 4 tissus, mais 2 sont spécifiques du pollen et 2 autres de l'anthère. BREWBAKER suggère donc que les estérases provenant du tapis (exine) et celle du pollen (intine) sont distinctes.

4-fonctions des protéines émises : Il est plausible qu'une des fonctions des protéines enzymatiques consiste à dégrader les constituants de la surface

stigmatique, afin de permettre le passage du tube pollinique ; ces protéines auraient également un rôle dans les processus de nutrition du pollen.

Les enzymes ne représentent qu'une faible fraction des substances émises ; KNOX et coll. (1972) impliquent les protéines enzymatiques dans la réaction de reconnaissance mais cette hypothèse n'est pas partagée par HESLOP-HARRISON (1975b).

II - LA SURFACE STIGMATIQUE ET LA REACTION D'INCOMPATIBILITE

L'analyse du rôle de la surface stigmatique dans les systèmes AIS et AIG a été effectuée en particulier par KONAR et LINSKENS (1966) et DICKINSON et LAWSON (1975).

La classification des stigmates s'effectue en fonction de la nature des sécrétions qui recouvrent les papilles ; ainsi, on distingue les stigmates sécréteurs des stigmates non sécréteurs (BURCK, 1901).

a) Les stigmates sécréteurs.

Dans ce cas, les papilles stigmatiques sont recouvertes d'une sécrétion abondante qui caractérise les plantes AIG (Solanacées, Liliacées, Rosacées et Onagracées) ; les sécrétions stigmatiques sont continues à maturité et forment un milieu favorable à la capture et à la germination du pollen. L'exsudat stigmatique est de nature lipidique, en général.

Chez *Petunia* (KONAR et LINSKENS, 1966) la couche lipidique recouvre toute la surface stigmatique et forme une "cuticule liquide".

Dans l'exsudat, MARTIN (1973) a identifié des acides gras (nombre d'atomes de carbone compris entre 11 et 20), des composés phénoliques (KONAR et LINSKENS, 1966) des oses et des acides aminés libres ; les mucopolysaccharides sont responsables de la viscosité de l'exsudat (LEWIS, 1949a) La teneur en protéines est faible chez les espèces AIG (KROH, 1964) ainsi chez *Lilium*, le taux de protéines n'est que de 7 % (LABARCA et coll., 1970).

Certaines activités enzymatiques ont été détectées dans l'exsudat, par des méthodes cytochimiques, en particulier des activités estérasiques (DICKINSON et LEWIS, 1975).

b) Les stigmates non sécréteurs.

Ils sont caractéristiques des espèces AIS (Crucifères et Composées en particulier). Les stigmates ne sont pas recouverts de sécrétion liquide ; cependant les papilles sont enduits d'une pellicule protéique hydratée, dégradée par la pronase et non par les lipases (MATTSON et coll., 1974).

Sous la pellicule protéique se trouve une cuticule de cutine ; des discontinuités, entre la couche pectocellulosique de la paroi et l'extérieur, permettent les mouvements d'eau (MATTSON et coll., 1974 ; HESLOP-HARRISON, 1975a).

Une activité estérasique apparaît au stade du bouton floral, augmente avec le processus de maturation et persiste jusqu'à l'anthèse.

Des protéines sont synthétisées (HESLOP-HARRISON, 1975a) au niveau du cytoplasme cortical de la papille puis diffusent à travers la couche pectocellulosique pour être déposées ensuite à la surface externe ; par son origine, cette pellicule protéique est considérée comme une sécrétion "sèche".

Ces protéines, par électrophorèse sur gel de polyacrylamide, se subdivisent en 3 bandes distinctes dont 2 possèdent de fortes activités estérasiques.

III - ASPECTS CYTOLOGIQUES ET BIOCHIMIQUES DE LA REACTION D'AUTOINCOMPATIBILITE

a) Incompatibilité sporophytique.

1-*la détermination du phénotype du pollen* : Il est désormais établi que le tapis, au moins chez les Composées et les Crucifères, élabore des substances et les transfère dans l'exine ; ces substances ont un rôle dans la détermination du phénotype incompatible du pollen. Les résultats expérimentaux ont démontré :

- le transfert de substances issues du tapis dans l'exine ;
- la présence de protéines d'incompatibilité dans la paroi du pollen ;
- l'origine de ces protéines.

.transfert de substances issues du tapis dans l'exine : les observations de HESLOP-HARRISON (1967, 1968), de HESLOP-HARRISON et coll. (1973), de DICKINSON et LEWIS (1973) ont montré que le "pollenkitt" (revêtement coloré des grains de pollen contenant des caroténoïdes) et les tryphines (revêtements hétérogènes de protéines et de lipides) sont issus du tapis (au moins chez les Liliacées, Crucifères, Malvacées et Composées) et s'accumulent dans les cavités sculptées de l'exine.

les protéines d'incompatibilité dans l'exine : la présence de protéines dans la paroi des grains de pollen a été signalée dans un grand nombre de genres. La participation de ces protéines à la réaction d'incompatibilité a été mise en évidence sur *Raphanus* (DICKINSON et LEWIS, 1973). Dans ce cas la tryphine qui entoure le grain de pollen participe à la réaction d'incompatibilité sur le stigmate. Chez *Iberis* (HESLOP-HARRISON et coll., 1974), les protéines de la paroi sont responsables de la réaction de rejet induite dans les papilles stigmatiques, dès les premières heures qui suivent la pollinisation incompatible.

l'origine des substances d'incompatibilité : DICKINSON et LEWIS (1973) ainsi que HESLOP-HARRISON et coll. (1974) ont démontré que les extraits de tryphine que le tapis accumule autour des grains de pollen, peuvent induire des symptômes typiques de la réaction d'arrêt. En effet, la tryphine, extraite du pollen de *Raphanus* pénètre dans les couches externes du stigmate et, lorsque il y a réaction d'incompatibilité, stimulent la production, par les papilles stigmatiques, de composés cellulosiques typiques (DICKINSON et LEWIS, 1973). Les travaux d'HESLOP-HARRISON et coll. (1974) sur *Iberis* ont de plus démontré que la réaction de rejet peut être induite de deux façons différentes ; l'extraction et l'analyse des constituants des parois ont démontré que ces protéines ou glycoprotéines induisant la réaction d'incompatibilité ont des poids moléculaires compris entre 10 000 et 25 000 daltons.

2-les différents sites de la réaction d'incompatibilité : Les travaux de LINSKENS et HEINEN (1962) ont démontré que les tubes polliniques des Crucifères peuvent synthétiser une cutinase leur permettant de traverser la barrière stigmatique ; aussi considère-t-on cette cuticule comme la barrière d'incompatibilité de la plupart des systèmes sporophytiques homomorphiques (KROH, 1964 ; LINSKENS et KROH, 1967 ; KROH et MUNTING, 1967).

Un simple contact (entre 4 et 10 minutes) du grain de pollen avec le stigmate suffit à réaliser l'activation de la cutinase et LINSKENS (1967) en conclut que la réaction induisant cette activité intervient entre des structures spécifiques de la paroi du pollen et les papilles stigmatiques.

ROGGEN (1972) pense que la phase de reconnaissance intervient, chez *Brassica*, au niveau de la couche de cire qui recouvre la cuticule et permet de reconnaître le pollen compatible de celui qui ne l'est pas. Seuls, les grains de pollen compatibles collant à la cire germent et activent la cutinase.

ROGGEN distingue 3 étapes dans la réaction :

1) une étape initiale de reconnaissance qui intervient lorsque les grains de pollen se fixent sur la cire des papilles ;

2) une réaction entre l'exine du pollen et la cuticule stigmatique par l'intermédiaire des zones dépourvues de cire ;

3) une activation de la cutinase et la pénétration du tube pollinique dans la paroi des papilles.

Les travaux de ROGGEN semblent être contradictoires avec ceux de MATTSON et coll. (1974) et d'HESLOP-HARRISON et coll. (1975) qui démontrent que la pellicule qui surmonte la cuticule chez *Silene vulgaris*, *Brassica oleraceae* et *Raphanus sativus*, ainsi que chez beaucoup d'autres Angiospermes, est essentiellement de nature protéique.

MATTSON et coll. (1974) ont montré que cette pellicule hydrophile peut initier et maintenir un mouvement d'eau à travers cette cuticule ; ces auteurs considèrent la liaison entre les protéines de l'exine et de la pellicule stigmatique comme le site primaire de la réaction de reconnaissance.

Il est donc probable que la réaction de reconnaissance intervient à différents niveaux, car DICKINSON et LEWIS (1973) ont observé chez *Raphanus* qu'une partie du pollen incompatible pénètre dans les papilles et donc n'est pas bloquée au niveau de la cuticule stigmatique.

Concernant ce dernier point, DICKINSON et LEWIS n'excluent pas la possibilité d'une absence de cutinase pour les tubes incompatibles mais concluent, sur la base des observations de KANNO et HINATA (1969) chez *Brassica*, que le mécanisme de la cutinase ne peut expliquer seul l'arrêt des tubes polliniques incompatibles chez les Crucifères.

Ils proposent pour *Raphanus* un système d'autoincompatibilité en 3 étapes :

1) un arrêt de la germination qui résulterait de l'interaction de substances de reconnaissance spécifiques libérées par le pollen à la surface stigmatique. Environ 60 % des grains de pollen incompatibles chez *Raphanus* sont éliminés par ce mécanisme qui n'est pas caractérisé par une modification ultrastructurale visible dans le cytoplasme du grain de pollen éliminé ;

2) l'incapacité à pénétrer la papille stigmatique correspond certainement à l'absence de la cutinase, pour un nombre relativement faible de tubes polliniques incompatibles bloqués à ce niveau. Suivant DICKINSON et LEWIS (1975) des parties de la surface stigmatique sont, pour des raisons physiques ou chimiques, plus accessibles que d'autres. Il est en effet possible que les réponses différentes observées pour des grains incompatibles résultent partiellement d'une hétérogénéité stigmatique ;

3) le blocage total de la croissance intervient après le dépôt de couches de callose dans les papilles stigmatiques quelques heures après la pollinisation. La synthèse de ces composés callosiques implique l'interaction entre le cytoplasme stigmatique et les substances produites par les tubes incompatibles ; cependant, le cytoplasme du tube pollinique ne présente pas de modification visible et on peut se demander, avec DICKINSON et LEWIS (1975),

si la croissance des tubes incompatibles qui traversent la cuticule est bloquée par l'inactivation des processus nécessaires à l'élongation ou par l'absence de substances nutritives en provenance du stigmate.

Enfin, HESLOP-HARRISON (1975b), a montré que l'inhibition stigmatique spécifique du pollen trinué et des systèmes sporophytiques est liée aux plantes présentant peu ou pas d'exsudat stigmatique.

3-les produits élaborés par le gène S dans les systèmes sporophytiques homomorphiques : Compte non tenu du nombre d'étapes impliquées dans la réaction d'incompatibilité chez les Crucifères, on peut admettre que :

1) toute la chaîne de réaction aboutissant au rejet est initiée par une étape de reconnaissance qui intervient entre des substances d'incompatibilité identiques, localisées respectivement dans l'exine du pollen et la pellicule stigmatique ;

2) ces substances sont vraisemblablement de nature protéique et constituent les produits des allèles S ou le résultat de l'interaction entre les produits des différents allèles S.

De telles conclusions prennent en compte la présence de protéines dans les parois des pollens et les pellicules stigmatiques, la capacité des protéines localisées dans l'exine à provoquer la réponse incompatible et la diffusion rapide d'antigènes et d'enzymes issus des grains de pollen humidifiés.

KING et coll. (1964), LEWIS et coll. (1967), KNOX et coll. (1970), KNOX (1973) ont montré que les protéines diffusant du pollen présentent des activités enzymatiques tels que estérase, amylase, ribonucléase, protéase, phosphatase acide et d'antigènes qui sont libérés dès les premières secondes ou minutes suivant l'hydratation du pollen.

Ces protéines sont, pour la plupart, issues de l'intine et non de l'exine ; HESLOP-HARRISON (1971), KNOX (1973), DICKINSON et LEWIS (1975) considèrent que le site effectif de la réaction de reconnaissance, dans les systèmes sporophytiques, se localise dans la paroi du pollen.

Le rôle des protéines codées par chaque allèle S a été fourni par NASRALLAH et WALLACE (1967) et par NASRALLAH et coll. (1969, 1973) : après injection à des lapins d'homogénats stigmatiques de *Brassica oleraceae*, ces auteurs récupèrent les antisérums correspondant aux anticorps spécifiques de chaque allèle S. Considérant que l'antigène est en fait la protéine S, ils ont démontré par électrophorèse et tests de double diffusion que chaque allèle S produit sa protéine spécifique et garde cette propriété au cours des générations successives. Ils suggèrent que les protéines spécifiques de chaque allèle S diffèrent

les unes des autres par substitution d'acides aminés. Il reste à déterminer si les protéines extraites correspondent bien au produit d'activité des gènes S. A partir de ces données, HESLOP-HARRISON et coll. (1975) ont pu proposer le modèle suivant pour l'autoincompatibilité sporophytique homomorphe (voir tableau 12).

b) Incompatibilité gamétophytique.

1-la détermination du phénotype du pollen : L'hypothèse selon laquelle le tapis détermine le phénotype incompatible des grains de pollen ne s'applique pas aux systèmes gamétophytiques chez lesquels les protéines S sont situées dans l'intine (KNOX et HESLOP-HARRISON, 1971b ; KNOX, 1973 ; HESLOP-HARRISON et coll., 1974) et correspondent certainement au produit d'élaboration de l'allèle S transmis à la microspore haploïde.

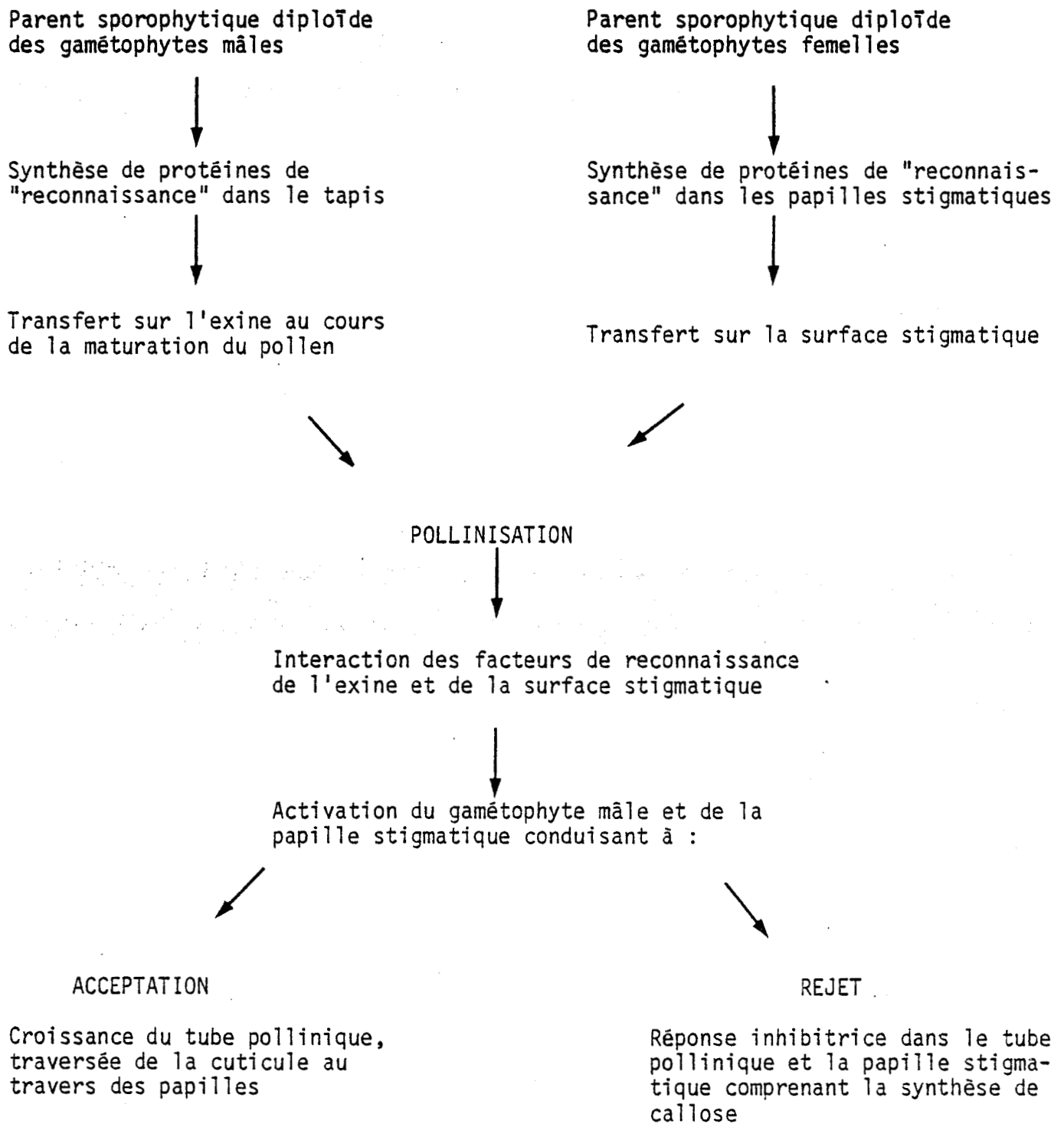
Sur la base de résultats indiquant que l'irradiation des anthères à un stade post-méiotique ne conduit pas à des mutations décelables du gène S chez *Oenothera organensis* et *Prunus avium*, LEWIS (1949a) en conclut que le gène S synthétise la substance responsable de l'incompatibilité au moment de la tétrade. Cette interprétation est discutable car on peut également attribuer l'absence de réponse aux radiations au cours des stades postméiotiques au fait que les mutations S induites dans les microspores mononucléées après le stade G1 ne sont pas transmises simultanément aux noyaux reproducteur et végétatif des grains de pollen et donc n'apparaissent pas dans le grain de pollen (mutation dans le noyau reproducteur) ou sont transmises à la génération suivante (noyau végétatif). Des expériences ultérieures viennent confirmer cette deuxième hypothèse (LEWIS, 1951).

2-la réaction autoincompatible des systèmes gamétophytiques :

.inhibition stigmatique : les aspects morphologiques de l'inhibition stigmatique du système AIG sont mal connus ; KNOX et HESLOP-HARRISON (1971b) ont montré chez *Phalaris tuberosa* que les grains de pollen compatibles et incompatibles libèrent très rapidement des protéines localisées dans l'intine et que les grains incompatibles germent parfois au cours des premières quarante minutes qui suivent l'autopollinisation. Les tubes polliniques ne traversent cependant pas le stigmate.

Chez *Oenothera organensis*, espèce qui présente un blocage localisé juste au-dessous du stigmate, DICKINSON et LAWSON (1975) ont réalisé l'étude ultrastructurale des 2 types de tubes et n'ont pas observé de différence morphologique notable ; ces auteurs suggèrent que l'inhibition de croissance

TABLEAU 12 : MODÈLE EXPLICATIF DE L'AUTOINCOMPATIBILITÉ SPOROPHYTIQUE HOMOMORPHIQUE (D'APRÈS HESLOP-HARRISON ET COLL., 1975).



résulte d'une insuffisance trophique d'ue à la formation de bouchons de callose qui empêchent la migration des réserves contenues dans le grain de pollen jusqu'à la partie apicale du tube.

.inhibition stylaire : les tubes polliniques peuvent effectuer, à l'intérieur du style, des distances s'échelonnant entre quelques microns jusqu'à la longueur totale du style, en fonction des espèces et de différents facteurs externes ou internes.

Le niveau de l'inhibition peut être évalué, au microscope optique, avec des colorants spécifiques (fuschine acide, bleu coton) ou des fluorochromes comme le bleu d'aniline qui présente une fluorescence dans l'ultra-violet. La technique la plus utilisée est la méthode de LINSKENS et ESSER (1957) et MARTIN (1958) qui met en évidence les dépôts de callose dans les tubes polliniques.

Au microscope électronique, les travaux de VAN DER PLUIJM et LINSKENS (1966) ont montré que l'AI chez *Petunia hybrida* détermine un épaissement de la paroi du tube pollinique et la dégénérescence du cytoplasme.

De NETTANCOURT et coll. (1973) ont démontré sur *Lycopersicon peruvianum* que :

- 1) les "espaces intercellulaires" du tissu conducteur stylaire sont homogènes et très opaques aux électrons dans le cas des styles vierges ;
- 2) dans le cas incompatible, la paroi du tube pollinique présente une structure bipartite avec une couche externe composée de fibrilles peu serrées et une couche interne homogène, riche en callose et moins dense aux électrons ;
- 3) quelques heures après la germination, lorsque les tubes polliniques ont parcouru le tiers du style, l'ergastoplasme présente un aspect spiralé de membranes concentriques parallèles similaires au REC (reticulum endoplasmique concentrique) défini par SHIH et RAPPAPORT (1971). Les parois des tubes incompatibles s'amincissent et de nombreuses particules de 0,2 μ de diamètre, souvent polyédriques s'accumulent dans le cytoplasme du tube ; ces particules, limitées extérieurement par une coque, ont un aspect granuleux et sont très différentes des inclusions cytoplasmiques des tubes compatibles ;
- 4) lorsque le cytoplasme de l'apex du tube pollinique est envahi par ces particules, la paroi interne du tube, de nature callosique, disparaît et la paroi externe s'épaissit très fort donnant à l'extrémité du tube un aspect gonflé ;
- 5) le tube incompatible éclate et libère des particules dans les espaces intercellulaires du tissu conducteur stylaire ; celui-ci est totalement envahi d'une substance possédant une fluidité suffisante pour permettre la dispersion du contenu des tubes. Sous U.V., après coloration au bleu d'aniline, l'extrémité éclatée du tube apparaît comme une énorme vésicule pratiquement dépourvue de callose.

Ces résultats montrent donc que la réaction d'incompatibilité n'est pas ici, une simple inhibition de croissance mais qu'elle aboutit à la destruction totale de l'apex du tube qui, après gonflement de la paroi externe et disparition de la paroi interne, éclate et libère des particules identiques

à celles que le tube pollinique compatible libère au cours du processus de syngamie : la réaction AI peut s'interpréter comme une anticipation du phénomène programmé pour avoir lieu lorsque le tube pollinique a atteint l'ovule.

La présence de REC dans les tubes incompatibles correspond peut être à une inhibition de la synthèse protéique et implique une interruption de l'activité métabolique précédant l'éclatement.

La callose s'accumule excessivement dans le cytoplasme du tube. Ce dépôt isole le cytoplasme de l'apex du tube du tissu stigmatique ou stylaire environnant et détermine l'inhibition.

3-biochimie de l'AIG : Les résultats d'analyses biochimiques permettent de préciser en partie la nature des substances concernées. Des auteurs ont ainsi mis en évidence la présence d'antigènes spécifiques des allèles S dans le pollen ; ainsi, MAKINEN et LEWIS (1962) et LEWIS et coll. (1967) ont démontré qu'à chaque allèle S d'un grain de pollen correspond un antigène bien défini. Chez *Oenothera organensis*, par immunodiffusion, ils observent une réaction de précipitation entre l'antisérum issu de l'injection d'un extrait de pollen d'allèle S défini et le pollen du même allèle S : les protéines libérées par le pollen dans le milieu gélosé et directement liées à la présence de l'allèle S sont localisées dans l'intine. Le fait que ces protéines soient responsables de la réaction de reconnaissance est controversé : parmi les substances libérées par le pollen, différents auteurs ont identifié des catalases (LOPRIORE, 1928 ; MAKINEN et BREWBAKER, 1967), des enzymes oxydants (OSTAPENKO, 1961 ; PODDUBNAYA-ARNOLDI et coll., 1961), des phosphatases acides, des estérases et des leucine aminopeptidases (MAKINEN et BREWBAKER, 1967). Ces divers enzymes ne peuvent être considérés comme agissant en tant que substances de reconnaissance.

De plus, il faut faire la distinction entre les espèces pour lesquelles l'inhibition est stigmatique ou juste post-stigmatique (*Oenothera*, Graminées) et les espèces où l'inhibition a lieu dans le style et pour lesquelles les substances d'incompatibilité sont synthétisées par le tube pollinique en voie de croissance et non préstockées dans le pollen (HESLOP-HARRISON, 1975a).

action du gène S dans le style : si l'on admet que le grain de pollen est porteur de substances spécifiques d'incompatibilité, il faut également déterminer la part du pistil dans le processus de reconnaissance et dans l'établissement de la réaction d'inhibition ; il est nécessaire de savoir si la réaction d'incompatibilité implique l'intervention de gènes dans le pistil, et si une telle action génique concerne la production, après

autopollinisation, de substances de reconnaissance par le pistil ou, avant autopollinisation, dans la définition du phénotype incompatible du pistil.

PICARD et DEMARLY (1952) et BREWBAKER et MAJUMDER (1961) ont vérifié cette hypothèse. En particulier par incorporation dans un milieu de culture artificiel d'extraits de styles vierges de *Petunia hybrida*, ces derniers auteurs ont montré que les extraits ont la propriété de reconnaître et d'inhiber, *in vitro*, la croissance de tubes polliniques porteurs d'un des 2 allèles S des styles. Des résultats identiques ont été trouvés chez *Lotus conniculatus* par MIRI et BUBAR (1966) et sur *Nicotiana alata* par TOMKOVA (1959) ; ainsi la présence dans les styles vierges d'une substance capable d'identifier le génotype S des grains de pollen cultivés *in vitro* et d'inhiber leur croissance en cas de croisements incompatibles est démontrée.

Comme les styles immatures ne présentent pas la réaction d'arrêt, on peut déduire que l'action du gène S intervient dans le pistil avant l'ouverture de la fleur. PANDEY (1967a) a isolé et identifié chez *Nicotiana alata* des isoenzymes péroxydasiques spécifiques des allèles S correspondants aux polypeptides synthétisés par le cistron de structure du complexe génique S. Ces résultats n'ont cependant pas été retrouvés chez d'autres espèces.

D'autres travaux ont mis en évidence des différences d'activité génique après xéno ou autopollinisation (TUPY, 1961 ; LINSKENS, 1965b) qui se caractérisent par des modifications des teneurs en protéines et en acides aminés libres ; de la même façon, VAN DER DONK (1975) a établi que :

- 1) la synthèse d'ARN et de protéines débute plus tardivement après l'interaction pollen-style dans le cas de pollinisation compatible ;
- 2) seuls, un petit nombre de pics d'ARN est à l'origine des différences entre styles auto et xéнопollinisés ; cet ARN exprime l'activité messager ;
- 3) le temps qui s'écoule entre la transcription et la réaction du style est d'environ 3 heures, or la reconnaissance du pollen a lieu beaucoup plus tôt dès le contact avec le style.

Sur la base de ces résultats, VAN DER DONK (1975) a imaginé une expérience qui permet de déterminer l'influence des protéines et de l'ARN des styles vierges pollinisés et du pollen sur la croissance des tubes polliniques *in vitro* : les résultats prouvent que l'ARN et les protéines des styles pollinisés peuvent inhiber la croissance des tubes polliniques (lorsqu'il y a identité des allèles) ou la stimuler (lorsque les allèles sont différents dans le style et le pollen).

Or, il est clair, depuis les résultats obtenus sur *Oenothera* par LEWIS et coll. (1967) et par HESLOP-HARRISON (1975a) sur les Graminées que les grains de pollen des espèces AIG à blocage stigmatique libèrent des protéines d'incompatibilité qui diffusent immédiatement après la pollinisation sur la

surface stigmatique ; pour les espèces AIG à blocage stylaire, la formation de substances d'incompatibilité est moins connue bien qu'il soit établi que les tubes polliniques qui effectuent leur croissance sur milieu artificiel synthétisent l'ARN nécessaire à l'élongation du tube pollinique ; le rôle de cet ARN dans l'élaboration éventuelle d'une substance d'incompatibilité n'est pas démontré.

Par ailleurs, il est intéressant de savoir s'il existe une relation entre les enzymes qui pourraient intervenir pour bloquer la croissance des tubes incompatibles (mécanisme d'opposition) ou dont l'absence ne permettrait pas la croissance du tube (mécanisme de complémentation) ; ainsi, les enzymes péroxydasiques règlent l'activité protéique, participent à la dégradation de l'AIA et catalysent un grand nombre de réactions nécessaires à la régulation de la croissance du tube pollinique dans le style.

PANDEY (1967) a mis en évidence, par électrophorèse sur gel d'amidon et révélation spécifique, des bandes isozymiques correspondant à chacun des allèles S présents dans les extraits stylaires ; il postule que ces isozymes péroxydasiques déterminent la spécificité du gène S et que la base de l'allélisme du locus S réside dans des combinaisons particulières d'isoenzymes spécifiques. Cependant, ces résultats ne sont pas généraux (NASRALLAH et coll., 1969 ; DESBOROUGH et PELOQUIN, 1968). SCHLOSSER (1961) a déterminé que la cytochrome oxydase, l'amylase et la phosphatase acide ont une activité plus élevée dans les tubes incompatibles de *Petunia* qu'au niveau des tubes polliniques compatibles. Bien que de tels résultats ne permettent pas d'établir aucune relation causale entre ces 3 enzymes et la manifestation de l'autoincompatibilité, ils mettent en évidence que l'inhibition de croissance des tubes incompatibles résulte d'un mécanisme plus complexe que la seule absence d'une (ou de) substance(s) de croissance.

D'autres enzymes présentent une augmentation d'activité après pollinisation compatible (ROGGEN, 1967). Si l'hypothèse de complémentarité est correcte, les tubes compatibles doivent contenir des enzymes qui ne sont pas présents dans les tubes incompatibles ; LINSKENS et coll. (1969) ont caractérisé 4 glycanes-hydrolases dans les extraits stylaires et polliniques (α -galactosidases, N-acétyl- β glucosaminidases, α -mannosidases et β -galactosidases).

L'activité spécifique des trois premiers enzymes a été trouvée beaucoup plus importante chez les styles xéнопollinisés et reste à un niveau très bas au niveau des styles autopollinisés et des grains de pollen.

De tels résultats impliquent la recherche de l'association entre les réactions de reconnaissance et le rôle joué par les glycanes-hydrolases lors de la croissance de la partie apicale du tube au travers des cellules du tissu conducteur stylaire.

CHAPITRE II : DÉTERMINISME DE L'AUTOINCOMPATIBILITÉ
CHEZ OENOTHERA MISSOURIENSIS ET
RÉSULTATS DES TRAVAUX PERSONNELS.

A. DETERMINISME GENETIQUE DE L'AUTOINCOMPATIBILITE.....	43
1) La tétraploïdie expérimentale.....	44
2) La méthode du taux de compatibilité.....	44
<i>a-demi-compatibilité</i>	
<i>b-compatibilité totale</i>	
B. ETUDE ULTRASTRUCTURALE.....	46
C. PHENOMENES PHYSIOLOGIQUES ACCOMPAGNANT LA REACTION DE REJET : MODIFI- CATION DU METABOLISME ENERGETIQUE.....	48
1) Matériel et méthodes.....	48
2) Résultats.....	50
3) Conclusions.....	51
D. BIOCHIMIE DE LA REACTION INCOMPATIBLE.....	52
1) Bilan des acides aminés.....	52
<i>a-matériel et méthodes</i>	
<i>b-résultats expérimentaux</i>	
<i>c-analyse des résultats</i>	
2) Evolution des acides aminés au cours de la pollinisation.....	54
<i>a-résultats expérimentaux</i>	
<i>b-analyse des résultats et conclusion</i>	

3) Analyse des protéines solubles.....	58
<i>a-matériel et méthodes</i>	
1)extraction des protéines végétales	
2)protocole d'extraction	
3)étude électrophorétique	
<i>b-résultats</i>	
1)description des fractionnements obtenus	
2)étude des fractions séparées en électrophorèse préparative	
3)résultats du fractionnement	
<i>c-conclusions des études réalisées sur les protéines des styles</i>	
4) Activités des glycanes hydrolases dans les extraits du style et du pollen.....	67
<i>a-identification des glycanes-hydrolases</i>	
<i>b-détermination du pH optimum d'action</i>	
<i>c-résultats</i>	
1)activités enzymatiques du pollen	
2)activités enzymatiques du style	
<i>d-activité des glycanes-hydrolases au cours de la germination du pollen in vitro</i>	
1)mise au point d'un milieu de culture	
2)dosage des activités enzymatiques	
3)évolution des activités enzymatiques en fonction du temps de germination	
<i>e-conclusions sur les activités enzymatiques</i>	
1)activités du pollen	
2)comparaison pollen-style	
5) Les phospholipides et l'incompatibilité de fécondation.....	73
<i>a-structure et répartition des phospholipides</i>	
<i>b-fonction des phospholipides membranaires</i>	
1)relations avec les chaînes de transport d'électrons	
2)rôle dans les réactions de transport membranaire	
3)influence des lipides sur les activités enzymatiques liées aux membranes	
<i>c-les phospholipides végétaux</i>	
1)distribution des acides gras dans les phospholipides végétaux	
2)précautions particulières à prendre pour l'extraction	
<i>d-résultats expérimentaux</i>	
1)analyse des esters méthyliques d'acides gras naturels	
2)analyse des acides gras entrant dans la composition des lipides totaux	
3)extraction, séparation et identification des phospholipides	
4)analyse qualitative des phospholipides	
5)analyse des AG constitutifs des phospholipides	
6) Les glycosphingolipides.....	88
<i>a-localisation</i>	
<i>b-structure des GSL - nomenclature</i>	
<i>c-métabolisme des GSL</i>	

d-fonctions des GSL

- 1) les GSL, récepteurs des surfaces cellulaires
- 2) les GSL, récepteurs moléculaires
- 3) GSL et tumorigénèse
- 4) autres fonctions des GSL

e-GSL et pollinisation

f-analyse des glycosphingolipides

g-analyse des constituants des GSL neutres

- 1) extraction et composition en acides gras
- 2) extraction des bases à longue chaîne et analyse
- 3) analyse de la copule osidique
- 4) distribution des acides gras
- 5) distribution des bases à longue chaîne
- 6) identification de la copule osidique

h-analyse des sulfatides

- 1) isolement des sulfolipides
- 2) dosage des sulfatides
- 3) résultats expérimentaux
- 4) analyse des constituants des sulfatides
- 5) conclusion et discussion

CHAPITRE II : DETERMINISME DE L'AUTOINCOMPATIBILITE
CHEZ OENOTHERA MISSOURIENSIS ET
RESULTATS DES TRAVAUX PERSONNELS

Oenothera missouriensis Sims (*Megapterium missouriense* Spach)

(Photo 1) est une Onagracée inferovariée du groupe des scutiformes caractérisée par des capsules ailées, à fleurs de type 4 : 4 sépales tachetés ou non selon la plante, 4 pétales jaunes, 8 étamines, 1 pistil avec ovaire infère, pluriovulé, à 4 loges, surmonté du tube du calice qui enveloppe un style de 10 à 12 cm, terminé par 4 grands lobes stigmatiques.

Photo 1 : *Oenothera missouriensis* Sims.

C'est une plante herbacée, vivace, à port couché, originaire du Missouri, du Kansas, du Texas et du Mexique, répandue en Europe uniquement dans les jardins, à titre ornemental.

Oenothera missouriensis est diploïde avec $2n = 14$ chromosomes formant à la méiose 7 bivalents dont la disjonction est régulière. Par les dimensions de ses fleurs (15-18 cm) et la longue durée de floraison (Mai à Octobre), c'est un matériel favorable aux opérations de pollinisation contrôlée.

A. DETERMINISME GÉNÉTIQUE DE L'AUTOINCOMPATIBILITÉ

Les mécanismes génétiques de la réaction d'autoincompatibilité chez *Oenothera missouriensis* ont été établis par LINDER (1952, 1954) qui a observé le faible nombre de capsules formées malgré l'abondante floraison d'une dizaine d'exemplaires d'*Oenothera missouriensis* cultivés dans le Jardin Botanique de Strasbourg. R. LINDER a ensuite montré que cette faible fertilité ne dépendait ni de l'inaptitude physiologique du pollen (capable de germer *in vitro*), ni de particularités structurales, morphologiques et biologiques défavorables.

Ce travail de Thèse de mon maître R. LINDER n'ayant pas été diffusé, il nous semble important de rappeler ici l'essentiel de ses résultats ; l'expérimentation effectuée sur un nombre considérable de plantes provenant de 15 clones différents a nettement mis en évidence la stérilité après autopollinisation (avec parfois une pseudocompatibilité faible chez les sujets très jeunes) et après certains croisements.

Le mécanisme factoriel de l'autoincompatibilité a pu être élucidé par l'analyse des résultats obtenus après pollinisations contrôlées de plantes d'origine diverse, ce qui permet de séparer, dans chaque lot, des groupes de compatibilité (intercompatibles entre eux mais intraincompatibles). Les ségrégations observées montrent que l'incompatibilité est conditionnée par une série d'allèles S (6 allèles différents dans la population initiale du Jardin Botanique de Strasbourg, dénommés S_1 à S_6).

LINDER, par de multiples croisements, a créé un homozygote S_1S_1 , appelé S_1 , qui servira de traceur de l'allèle S_1 chez *Oenothera missouriensis* : en effet, l'absence de nouaison après croisement par S_1 indique que la plante pollinisée contient l'allèle S_1 .

I - LA TETRAPLOIDIE EXPERIMENTALE

L'application répétée de colchicine sur les plantules permet d'obtenir des individus tétraploïdes. On sait que dans certains cas la polyploïdie lève l'incompatibilité de fécondation (LEWIS, 1943, 1947, 1949a ; ATWOOD et BREWBAKER, 1953 ; BREWBAKER, 1954, 1958 ; SAMPSON, 1960 ; ANNERSTEDT et LUNDQVIST, 1967). Les résultats montrent que ce fait n'est pas vérifié pour *Oenothera missouriensis*, les polyploïdes restant autostériles.

Avec les tétraploïdes se pose un problème intéressant : une plante S_1S_2 tétraploïdisée devient $S_1S_1S_2S_2$ et donne du pollen S_1S_1 , S_1S_2 et S_2S_2 qui est bloqué dans le style $S_1S_1S_2S_2$; un pollen S_3S_4 est compatible mais pour un pollen S_1S_3 possédant l'allèle S_1 commun, LINDER a pu définir la possibilité de fécondation par la méthode dite du taux de compatibilité.

II - LA METHODE DU TAUX DE COMPATIBILITE

C'est le pourcentage de résultats positifs sur l'ensemble des opérations de croisement faites dans une population. Le taux de compatibilité T_c est une grandeur intéressante à établir d'abord pour les populations diploïdes où les relations sont connues, ce qui pourra justifier l'emploi ultérieur du T_c dans les populations tétraploïdes. Il faut voir si le T_c expérimental, qui porte sur les nombres observés, correspond au T_c prévisible, calculé d'après la composition des groupes, et au T_c optimum, établi pour des groupes d'égale composition.

Pour une population issue du croisement demi compatible, par conséquent ne comprenant que 2 groupes de compatibilité A et B, le T_c prévisible est donné par l'expression :

$$\frac{2 AB}{(A + B)^2}$$

Si $A = B$, T_c est optimum et égal à 1/2 ou 50 %.

Un croisement totalement compatible donne naissance à un lot comportant 4 groupes de compatibilité A, B, C, D. Le Tc prévisible est :

$$\frac{2 [A (B + C + D) + B (C + D) + C D]}{(A + B + C + D)^2}$$

Si A = B = C = D, Tc est optimum = 3/4 ou 75 %.

Les résultats des opérations effectuées dans 16 populations issues de croisements demi compatibles et dans 10 populations issues de croisements totalement compatibles, montrent que le Tc expérimental et le Tc prévisible se groupent aisément autour du Tc optimum 50 % ou 75 % avec des écarts plus ou moins faibles selon le nombre de plantes de la population et le nombre d'opérations effectuées. L'emploi du Tc se justifie donc.

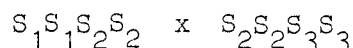
Dans les populations tétraploïdes, les opérations d'intercompatibilité établissent le Tc expérimental qui, comparé aux possibilités du Tc optimum, permet de dire si la différence entre style et pollen doit porter sur un ou sur 2 allèles pour qu'il y ait compatibilité.

Pour établir les possibilités du Tc optimum, il faut séparer la demi compatibilité de la compatibilité totale et dans chacun de ces cas envisager les 2 éventualités :

- différence pour les 2 allèles ;
- différence pour un seul allèle.

a) Demi compatibilité.

Les 2 plantes parentes ont un allèle commun. Ex :

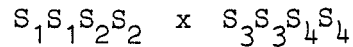


1-si la différence entre style et pollen doit porter sur 2 allèles pour qu'il y ait compatibilité, seul fonctionne le pollen $S_2 S_3$ dans ce croisement ; dans la population qui en est issue, les relations d'intercompatibilité entre plantes comportent un Tc optimum de 5,5 % ;

2- s'il suffit qu'un allèle soit différent, le pollen fonctionnel est $S_3 S_3$ et $S_2 S_3$. Dans la descendance de ce croisement, les relations de compatibilité se traduisent par un Tc optimum de 17,1 %.

b) Compatibilité totale.

Les 2 plantes parentes diffèrent par tous leurs allèles. Ex :



Le pollen entier du père est compatible.

1) 2 allèles différents étant nécessaires, les croisements entre plantes de la population donnent un Tc optimum de 15,7 % ;

2) s'il suffit que la différence porte sur un allèle, le Tc optimum devient 48,1 %.

Le Tc expérimental a été obtenu respectivement dans 3 populations pour chacun des cas :

- demi compatible.....	15,8 %	20,4 %	15 %
- compatibilité totale.....	41,3 %	37,6 %	47 %

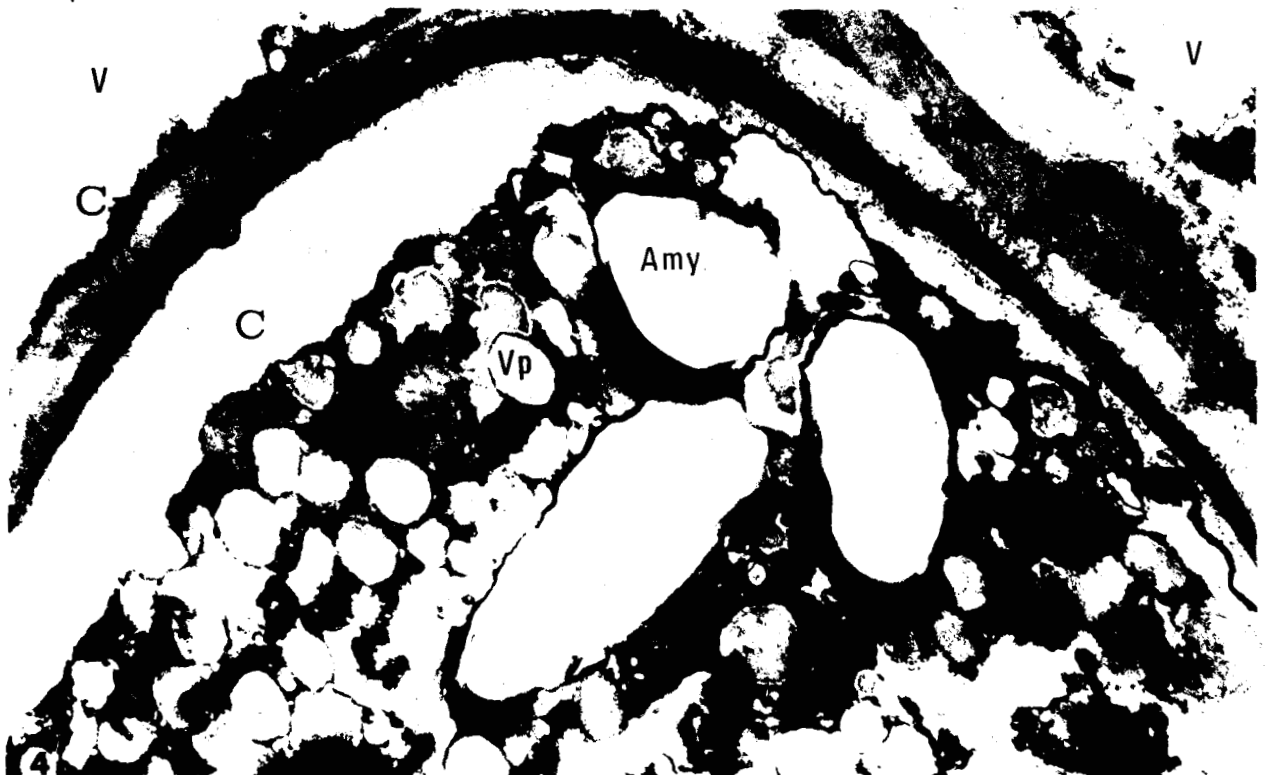
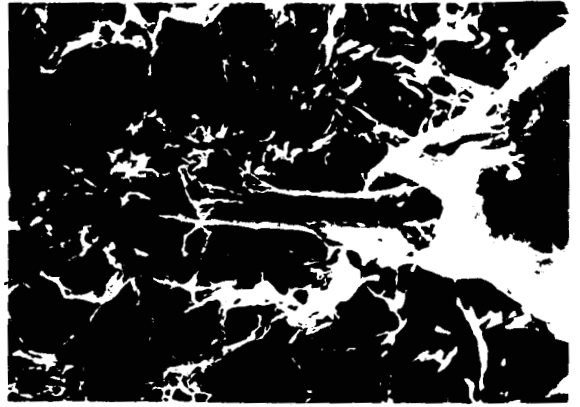
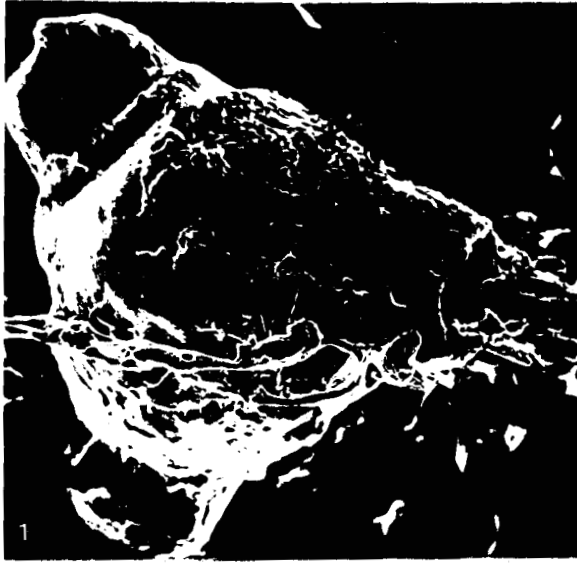
Ces valeurs se groupent nettement autour des valeurs du Tc optimum : 17,1 % et 48,1 % qui caractérisent la même alternative : différence portant sur un seul allèle.

Dans *Oenothera missouriensis* tétraploïde, les résultats montrent qu'il faut et qu'il suffit que la différence porte sur un allèle S entre style et pollen pour que ce dernier soit compatible.

Le déterminisme génétique de l'autoincompatibilité pour cette espèce étant rappelé, nous rapportons les résultats d'une brève étude morphologique en microscopie électronique avant d'envisager l'analyse physiologique et biochimique du phénomène.

B. ETUDE ULTRASTRUCTURALE

La technique de microscopie électronique à balayage permet de bien visualiser la germination d'un grain de pollen sur un stigmate compatible (planche I, figures 1 et 2) ; le tube pollinique est émis à partir d'un pore germinatif ; le grain de pollen est entouré de filaments de viscine.



La planche I figures 3 et 4) présente une coupe transversale d'un tube pollinique en cours de croissance dans un style compatible : le cytoplasme du tube pollinique est très dense ; la callose est localisée sur les parois, dans le cas incompatible, la callose se dépose essentiellement à l'extrémité du tube pollinique.

PLANCHE I : *Oenothera missouriensis* : Morphologie du pollen et ultrastructure du style après pollinisation.

Abréviations : Amy : amyloplaste ; Ap : ouverture ; C : partie callosique de la paroi du tube pollinique ; Cy. : liséré cytoplasmique d'une cellule conductrice ; Pc : paroi cellulosique de la cellule conductrice ; Pm : partie microfibrillaire de la paroi du tube pollinique ; Tc : tissu conducteur ; Tp : tube pollinique ; V : vacuole ; Vi : filament de viscine ; Vp : vésicule pollinique.

Fig. 1 - 2 : Pollen d'*Oenothera missouriensis* de plante de génotype S_1S_1 sur stigmate de plante de génotype S_2S_4 (pollinisation compatible) en microscopie électronique à balayage (après fixation au glutaraldéhyde à 4 %, à l'azote liquide et lyophilisation). Fig. 1 : Morphologie du pollen (x 1 900). Le grain subhémisphérique porte au plan équatorial trois ouvertures (Ap) en forme de dôme dont la voûte est occupée par le pore germinatif. De la surface du sporoderme partent des filaments de viscine (Vi). - Fig. 2 : Tube pollinique sortant du pore germinatif (x 1 800) : le tube pollinique s'insère entre les papilles stigmatiques (à l'état plasmolysé sur la préparation).

Fig. 3 - 4 : Coupe transversale dans le style après pollinisation compatible : style S_1S_1 , tube pollinique S_2 ou S_4 (provenant de plante S_2S_4). Fig. 3 : Tube pollinique dans le tissu conducteur (x 4 200). Le tube pollinique (Tp) est placé dans la paroi cellulosique (Pc) de cellules moyennes du tissu conducteur (Tc). La paroi du tube est composée de 2 couches : la couche externe microfibrillaire (Pm) et la couche interne, très transparente, callosique (C). Fig. 4 : Détail du tube pollinique de la figure précédente (x 21 300). Le tube pollinique s'insère dans la paroi cellulosique (Pc) des cellules conductrices dont on voit la vacuole (V), bordée d'un liséré cytoplasmique (Cy). Le protoplasme du tube est chargé de vésicules polliniques (Vp) d'origine golgienne, de taille très variée, et d'amyloplastés (Amy). La paroi du tube est composée de deux couches l'une microfibrillaire (Pm) et l'autre callosique (C) traversée d'éléments provenant du plasmalemma. La paroi cellulosique de la cellule conductrice droite est traversée par une couche microfibrillaire (Pm) qui pourrait correspondre à la paroi d'un tube pollinique adjacent en coupe tangentielle.

C. PHÉNOMÈNES PHYSIOLOGIQUES ACCOMPAGNANT LA RÉACTION DE REJET : MODIFICATION DU MÉTABOLISME ÉNERGÉTIQUE

La réaction d'incompatibilité est un processus actif, impliquant à la fois la participation du pollen et du style ; nous avons analysé les variations du métabolisme énergétique des styles non pollinisés ou ayant subi la pollinisation compatible ou incompatible par l'enregistrement des échanges gazeux respiratoires. Des mesures de ce type ont déjà été effectuées sur d'autres matériels (HSIANG, 1951 ; LINSKENS, 1953, 1955, 1965b ; TUPY, 1962 ; STANLEY, 1964), permettant une appréhension globale de la situation métabolique du pistil.

I - MATERIEL ET METHODES

Les plantes utilisées sont celles qui ont servi à la détermination du mécanisme de transmission héréditaire de l'incompatibilité chez *Oenothera missouriensis* Sims (LINDER, 1954).

Elles se composent de deux génotypes répandus dans les jardins européens :

- le génotype S_1S_2 - plante Bb ;
- le génotype S_2S_4 - plante Bg

et du phénotype homozygote obtenu expérimentalement (LINDER, 1954) : S_1S_1 . Ces génotypes proviennent du Jardin Botanique où ils sont cultivés en pleine terre.

En Juin-Juillet, époque de la pleine floraison, les boutons floraux sont récoltés, le soir, avant leur épanouissement ; après dissection, on isole les anthères et les styles vierges (photo 2).

Photo 2.

L'obtention des styles autopollinisés et xéнопollinisés est réalisée de la façon suivante : la corolle des fleurs non pollinisées est délicatement ouverte et les anthères prélevées. La pollinisation s'effectue ensuite par dépôt d'un peu de pollen mature à la surface du stigmate (photo 3).

Photo 3.

Les fleurs sont pollinisées

- soit en combinaison incompatible :
- . pistils S_1S_1 , S_1S_2 , S_2S_4 avec le pollen issu des mêmes clones
- soit en combinaison compatible :
- . pistils S_1S_1 x pollen S_2S_4 (S_1 x Bg)
- . pistils S_2S_4 x pollen S_1S_1 (Bg x S_1)
- soit en combinaison demi compatible :
- . pistils S_1S_2 x pollen S_2S_4 (Bb x Bg).

L'analyse de la consommation d'oxygène est obtenue par la méthode manométrique de WARBURG (fiche technique n° 1) : immédiatement après la pollinisation, chaque style est séparé de l'ovaire et introduit dans une fiole de Warburg ; celle-ci est placée dans un bain-marie thermostaté ($25 \pm 0,1^\circ\text{C}$) et reliée à un manomètre. La première mesure est effectuée dès que l'équilibre des températures est réalisé et les autres mesures se succèdent toutes les 30 minutes. Dans une première série de mesures, les styles ont été placés dans 2 ml d'une solution de Ringer mais les résultats étant identiques à ceux obtenus en l'absence de solution nutritive, toutes les autres expériences ont été faites "à sec".

TABLEAU 13 : CONSOMMATION D'OXYGÈNE DES STYLES D'*OENOTHERA MISSOURIENSIS*
VIERGES, AUTOPOLLINISÉS ET XÉNOPOLLINISÉS (BRIS ET LORCH, 1970).

Temps en minutes	O ₂ ABSORBE (μl PAR GRAMME DE STYLE)								
	S ₁ v	S ₁ ⊕	S ₁ x Bg	Bb v	Bb ⊕	Bb x Bg	Bg v	Bg ⊕	Bg x S ₁
30	8	20	16	20	25	25	15	30	15
60	20	42	31	37	50	45	30	63	40
90	29	61	48	54	75	68	45	95	55
120	41	78	63	70	98	84	60	130	75
150	53	105	78	87	122	113	75	140	95
180	66	125	95	102	145	130	88	185	115
210	81	148	108	117	170	148	105	210	133
240	97	169	125	133	193	165	123	230	152
270	111	188	147	148	213	180	138	245	173
300	127	207	168	161	235	199	152	285	195
330	143	230	178	175	258	213	165	320	216
360	158	250	198	190	275	225	182	343	235
390	175	270	213	205	298	242	198	370	253
420	192	295	225	220	316	260	213	395	275
450	208	313	250	235	335	275	230	423	295
480	225	332	258	250	353	285	245	445	304
510	238	355	275	263	373	300	258	462	308
540	255	375	290	272	388	325	273	490	340
570	268	395	307	295	406	335	286	500	360
600	285	418	325	307	423	350	301	515	398
630	300	440	345	324	438	362	315	555	416
660	313	460	365	338	454	375	330	572	440
690	328	483	383	354	470	390	343	587	457
720	342	487	397	370	485	403	355	608	476



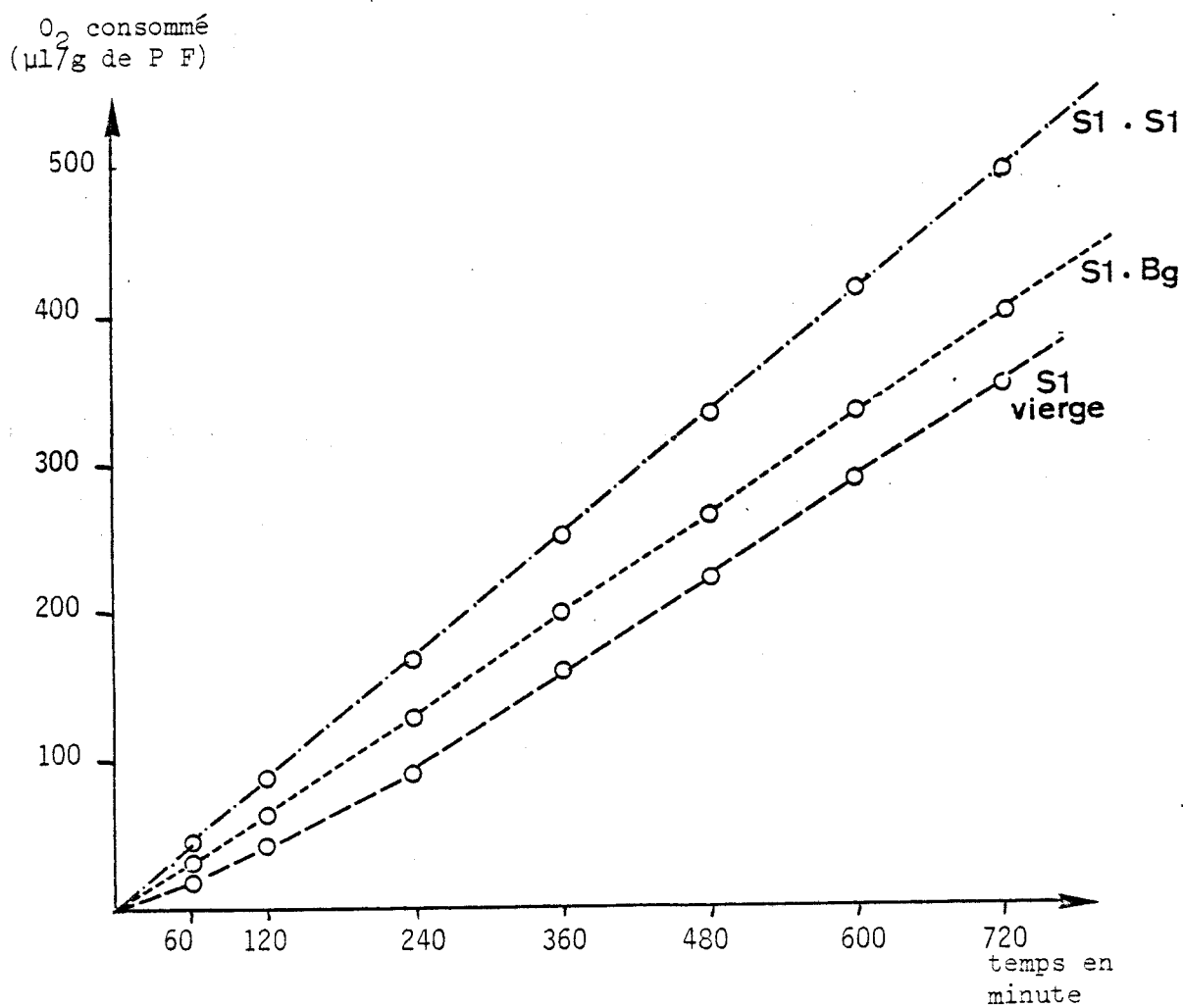
Pour chaque génotype et chaque type de pollinisation, l'opération est répétée 8 fois ; les résultats rapportent les courbes moyennes obtenues ; elles correspondent à la consommation d'oxygène exprimée en microlitres, à 0°C et 760 mm de mercure par gramme de poids frais en fonction du temps.

II - RESULTATS (BRIS et LORCH, 1970)

Le tableau 13 et les diagrammes 14, 15 et 16 rapportant la consommation d'oxygène des styles en fonction de la pollinisation, permettent de déduire les conclusions suivantes :

- pour tous les génotypes étudiés, S_1S_1 , S_1S_2 , S_2S_4 , les styles présentent une consommation d'oxygène dépendant de la pollinisation ; l'absorption d'oxygène des styles vierges est toujours inférieure à celle des styles pollinisés : elle s'exprime, en fonction du temps, sous la forme d'une droite dont la pente est légèrement différente selon les clônes : respectivement 0,52 pour S_1 , 0,42 pour Bg et 0,50 pour Bb. Cette droite exprime une consommation d'oxygène régulière ;
- la pollinisation compatible induit dans les 2 cas ($S_1 \times Bg$ et $Bg \times S_1$) une augmentation des échanges respiratoires qui se manifeste dès les premières mesures. La courbe de consommation d'oxygène s'exprime également sous la forme d'une droite dont la pente est plus élevée que dans le cas des styles vierges : 0,58 pour $S_1 \times Bg$ et 0,68 pour $Bg \times S_1$; les valeurs mesurées de consommation sont donc toujours supérieures à celles de styles non pollinisés ;
- la pollinisation incompatible se traduit au niveau des styles par une diminution encore plus rapide de la pression partielle d'oxygène. Cette consommation d'oxygène s'atténue légèrement après 5 heures de pollinisation pour les plantes S_1 et Bb, tandis que dans le cas de la plante Bg, la courbe s'infléchit régulièrement indiquant une utilisation intense d'oxygène dès la pollinisation qui diminue régulièrement, tout en restant supérieure aux valeurs mesurées dans le cas de la pollinisation compatible ;
- pour la pollinisation demi compatible ($Bb \times Bg$), les mesures donnent des résultats intermédiaires entre ceux présentés par les styles vierges et pollinisés de façon incompatible. Il faut noter que la droite présente une diminution de pente après 5 heures de pollinisation de manière similaire à l'infléchissement observé dans le cas incompatible.

FIGURE 14 : CONSOMMATION D'OXYGÈNE DES STYLES S_1S_1 ,
VIERGES, AUTOPOLLINISÉS ET XÉNOPOLLINISÉS
(BRIS ET LORCH, 1970).



III - CONCLUSIONS

Malgré l'imprécision de la méthode utilisée, la comparaison, toutes choses égales par ailleurs, des résultats enregistrés dans les variations de la consommation d'oxygène en fonction du type de pollinisation, apporte une information intéressante.

En effet, il faut noter que la technique employée est une méthode globale qui :

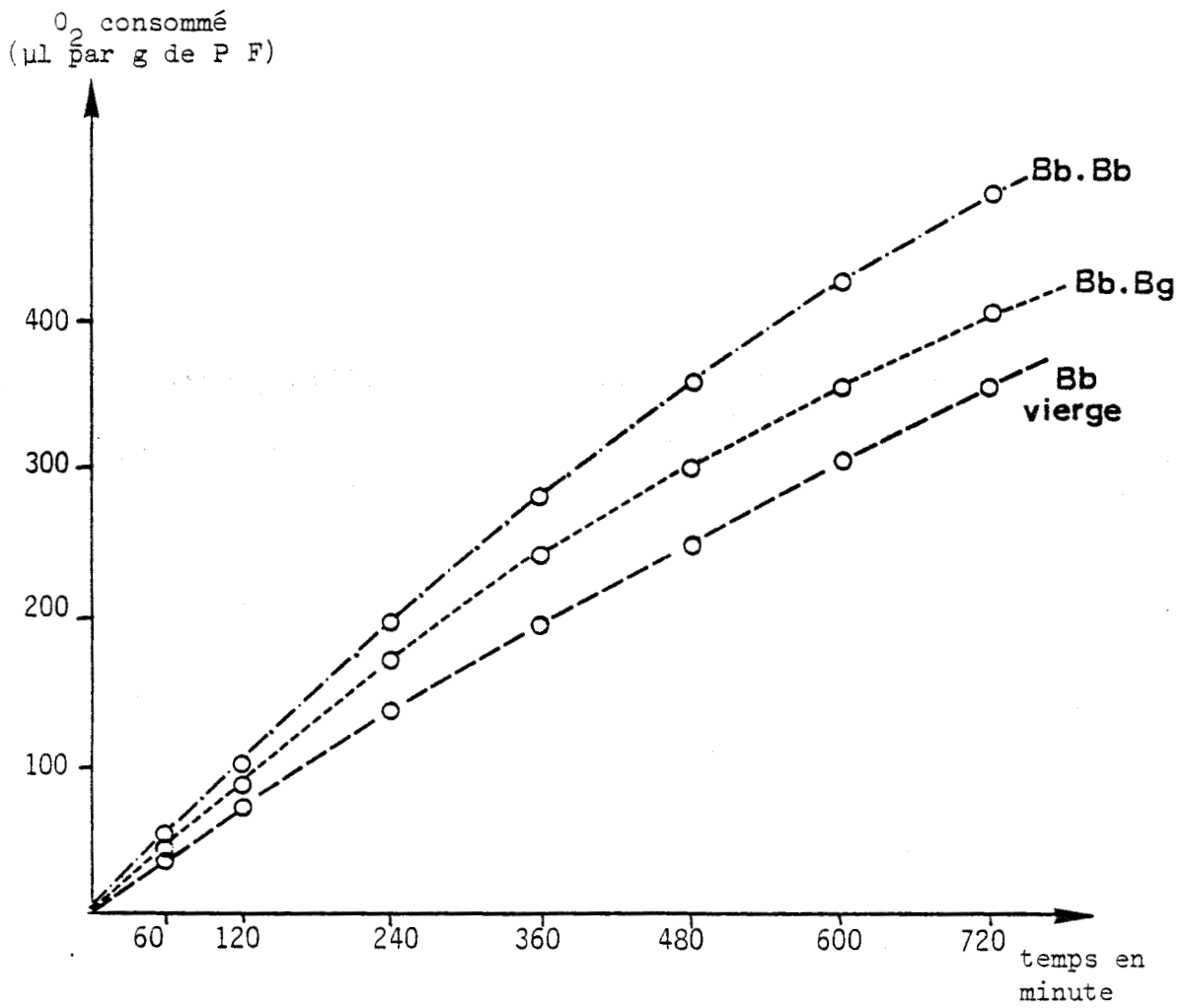
- 1) ne permet pas de distinguer les échanges gazeux des tissus stylaires impliqués dans la réaction d'incompatibilité de ceux des autres tissus ;
- 2) ne tient pas compte des difficultés de diffusion des gaz dans les tissus et par conséquent de sa vitesse de diffusion ;
- 3) la pollinisation est réalisée *in vitro*, sur des styles amputés des ovaires sous-jacents, dans des conditions artificielles.

Cependant, les résultats obtenus sont en accord avec ceux présentés par HSIANG (1951) qui a démontré que la pollinisation était suivie d'une brusque augmentation de l'activité respiratoire chez *Cymbidium lowianum* et surtout avec ceux de LINSKENS (1955) qui a mis en évidence sur *Petunia hybrida*, une augmentation plus importante de la consommation d'oxygène (de l'ordre de 20 %) pour les styles autopollinisés, par rapport aux styles xéнопollinisés ; or, *Petunia hybrida* possède le même type d'incompatibilité gamétophytique qu'*Oenothera missouriensis*.

D'autre part, LINSKENS et SCHRAUWEN (1966) ont pu déceler la formation d'un gradient de pression partielle d'oxygène dans le style vierge de *Petunia hybrida* arrivé à maturité : dans la partie supérieure du style, la pO_2 est relativement élevée mais elle diminue brutalement au niveau de l'ovaire ; après pollinisation, le passage de l'extrémité des tubes polliniques s'accompagne d'une diminution de la pression d'oxygène qui se déplace le long du style en suivant la croissance des tubes. Finalement, il semble que la baisse de la pression partielle d'oxygène au niveau de l'ovaire constitue l'un des facteurs principaux de l'éclatement du tube pollinique et de la libération des gamètes.

Les résultats expérimentaux permettent donc de postuler que le mécanisme de la réaction d'incompatibilité chez *Oenothera missouriensis* est un processus actif qui, en réorientant le métabolisme, impliquera une dépense d'énergie importante.

FIGURE 15 : CONSOMMATION D'OXYGÈNE DES STYLES S₁S₂,
VIERGES, AUTOPOLLINISÉS ET XÉNOPOLLINISÉS
(BRIS ET LORCH, 1970).



Cette exigence est un fait capital : si la croissance rapide du tube pollinique à travers le tissu conducteur du style nécessite un apport énergétique nécessaire à la biosynthèse de la paroi et du cytoplasme du tube, la réaction de blocage du tube incompatible exigera une consommation d'oxygène encore plus élevée ; l'énergie libérée permettra de réaliser un ensemble de biosynthèses cytoplasmiques différentes en particulier glucidiques, se traduisant par exemple par l'élaboration d'un bouchon de callose.

D'autres changements biochimiques liés à l'autoincompatibilité ont été envisagés chez *Oenothera missouriensis*, le bilan des acides aminés libres des styles après pollinisations a constitué une première étape .

Cette étude, dont les principaux aspects sont rapportés ci-dessous, a été réalisée dans le cadre du groupe de travail sur l'incompatibilité de Lille dans lequel je me suis intégré.

D. BIOCHIMIE DE LA RÉACTION INCOMPATIBLE

I - BILAN DES ACIDES AMINES

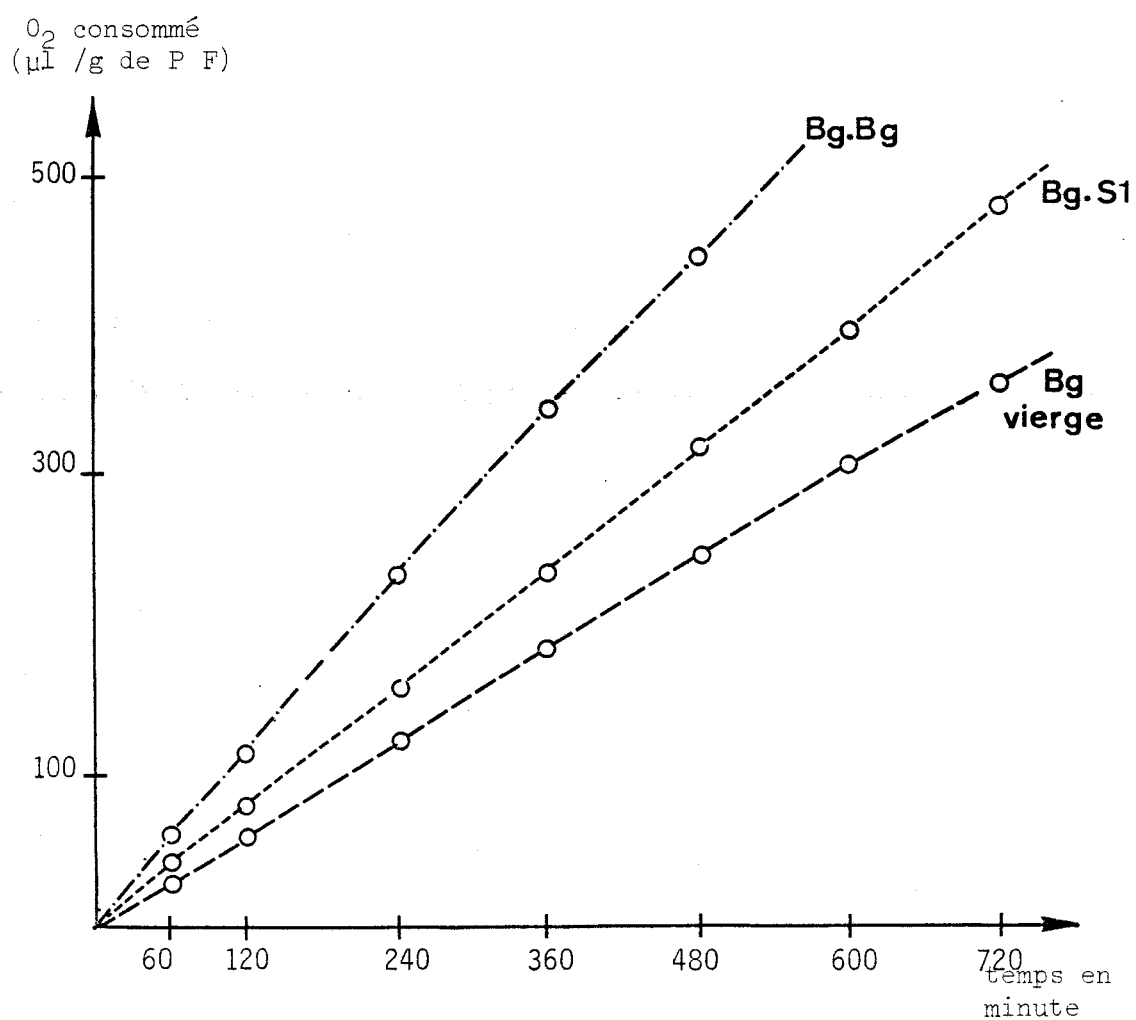
La teneur en acides aminés du pollen et du style après pollinisation, envisagée sous ses aspects qualitatifs et quantitatifs, peut être une source d'information utile dans l'analyse du phénomène d'incompatibilité.

Nous rapportons ci-après les études qui ont permis de préciser les teneurs en acides aminés des styles vierges et des pollens de différents génotypes d'incompatibilité ainsi que leur modification au cours du développement normal du tube pollinique (COUSTAUT et LINDER, 1966 ; LINDER et LINSKENS, 1972). Ainsi, les caractéristiques de la phase d'inhibition sont-elles affinées.

a) Matériel et méthodes.

Les pollinisations sont réalisées comme précédemment (page 49). Après des temps de pollinisation variant de 0 à 48 heures, les styles sont prélevés et congelés à -20°C . L'extraction des acides aminés s'effectue sur du matériel lyophilisé : 100 mg de styles ou de pollen sont traités à l'éthanol 80° ; les pigments, solubles dans l'alcool, sont ensuite éliminés par lavage au

FIGURE 16 : CONSOMMATION D'OXYGÈNE DES STYLES S_2S_4 ,
VIERGES, AUTOPOLLINISÉS ET XÉNOPOLLINISÉS
(BRIS ET LORCH, 1970).



chloroforme ; l'extrait est ensuite passé sur colonne échangeuse d'ions Technicon avec élution sélective des acides aminés par un tampon de force ionique croissante (fiche technique n° 2).

b) Résultats expérimentaux.

Le tableau 17 reprend les résultats concernant les clônes étudiés (S₁, Bb, Bg) :

- 19 acides aminés sont identifiés : acide aspartique, thréonine, sérine, acide glutamique, proline, glycofolle, alanine, acide α -aminobutyrique, valine, isoleucine, leucine, tyrosine, phénylalanine, éthanolamine, acide γ aminobutyrique, ornithine, lysine, histidine, arginine.

Ces 19 acides aminés sont omniprésents dans tous les génotypes étudiés : il n'y a donc pas de variation, autre que quantitative, entre les clônes envisagés.

La teneur globale en acides aminés est beaucoup plus élevée dans le pollen que dans le style : le rapport teneur du pollen/teneur du style vierge varie entre 3,6 et 6,3 pour les différents génotypes. Pour certains acides aminés trouvés préférentiellement dans le pollen, la différence peut être encore plus marquée : la proline surtout présente une concentration 200 fois plus élevée dans le pollen que dans le style ; l'histidine et l'arginine, à l'état de traces dans le style sont bien représentées dans le pollen (jusqu'à 83 fois plus). Le taux d'alanine, élevé dans le style, peut l'être 5 fois plus dans le pollen.

Des différences quantitatives apparaissent dans des populations de même génotype d'incompatibilité provenant de clônes différents : les allèles S n'interviennent donc pas de façon significative dans la teneur et dans la répartition des acides aminés libres.

Par contre, la pollinisation, et en particulier le type de pollinisation compatible ou incompatible, a une influence remarquable sur la teneur globale en acides aminés libres du style : les styles en situation compatible ont une teneur généralement inférieure à celle des styles incompatibles : 3 000 nanomoles/g dans ce dernier cas contre 1 200 à 2 600 nanomoles/g pour les styles xénopollinisés ; les styles vierges se situant à une moyenne de 900 à 1 300 nanomoles/g ont une teneur en acides aminés libres encore plus faible.

Les différences entre auto et xénopollinisation sont surtout accusées pour certains aminoacides comme l'acide glutamique, la valine, l'alanine et l'ensemble éthanolamine/acide γ aminobutyrique.

TABLEAU 17 : SPECTRE DES ACIDES AMINÉS LIBRES DU POLLEN, DU STYLE VIERGE, DES STYLES AUTOPOLLINISÉS ET XÉNOPOLLINISÉS APRÈS 20 HEURES DE POLLINISATION (LES TENEURS SONT EXPRIMÉES EN NANOMOLÉES PAR GRAMME). (COUSTAUT ET LINDER, 1967).

Génotype Plante	POLLEN			STYLES VIERGES			STYLES AUTOPOLLINISÉS			STYLES XÉNOPOLLINISÉS	
	S_1S_1 S_1	S_1S_2 Bb	S_2S_h Bg	S_1S_1 S_1	S_1S_2 Bb	S_2S_h Bg	S_1S_1 S_1	S_1S_2 Bb	S_2S_h Bg	$S_1S_1 \times S_1S_2$ $S_1 \times Ba$	$S_2S_h \times S_1S_1$ Bg \times S_1
Ac. aspartique	225	504	167	60	48	54	120	64	103	127	-
Thréonine	90	100	60	163	93	142	218	436	240	180	286
Sérine	430	435	325	147	162	-	343	377	240	857	-
Ac. glutamique	283	1184	104	239	251	259	542	224	321	8	52
Proline	4369	4261	3011	22	18	29	466	719	960	509	507
Glycocolle	64	72	79	25	27	11	58	51	38	36	25
Alanine	66	359	311	173	160	66	493	265	319	225	201
Ac. amino- butyrique	ϵ	143	11	-	ϵ	ϵ	13	ϵ	4	ϵ	-
Valine	67	75	49	30	27	30	113	102	97	67	62
Isoleucine	40	31	22	14	12	12	68	49	44	38	21
Leucine	33	30	31	8	7	7	41	27	26	18	11
Tyrosine	7	6	11	9	15	12	21	27	25	-	10
Phénylalanine	26	31	29	17	15	12	40	47	51	-	23
Ethanolamine	290	187	844	373	439	205	673	810	514	151	341
Ac. amino- butyrique	1035	447	-	-	-	-	-	-	-	284	-
Ornithine	48	9	12	10	10	13	16	11	14	27	21
Lysine	17	18	36	14	20	18	28	31	45	-	13
Histidine	289	335	67	9	4	5	74	35	26	51	19
Arginine	192	156	65	4	10	7	37	19	36	-	14
Teneur globale	7571	8383	5234	1317	1318	882	3364	3294	3103	2578	1606

3111
SUG

c) Analyse des résultats.

Certains acides aminés sont relativement très abondants :

- la forte teneur en proline du pollen d'*Oenothera* n'est pas spécifique : ce fait est également relevé dans le pollen d'autres espèces (TUPY, 1961 ; LINSKENS et TUPY, 1966) ;
- la teneur en sérine et/ou éthanolamine qui dérive de la sérine par décarboxylation est relativement élevée. Remarquons que ces deux composants sont, avec l'acide glutamique, la thréonine et l'alanine, les éléments majeurs des aminoacides libres du style.

La pollinisation induisant des modifications importantes dans la teneur et la répartition des acides aminés, une étude sur l'évolution de la répartition des acides aminés en fonction de temps de pollinisations définis s'est avérée nécessaire.

II - EVOLUTION DES ACIDES AMINES AU COURS DE LA POLLINISATION

L'expérimentation (LINDER et LINSKENS, 1972) a été réalisée, dans les mêmes conditions que précédemment, sur deux génotypes S_1S_1 et S_2S_4 (plantes S_1 et Bg) ; les bilans comparatifs sont effectués sur les styles vierges (S_1S_1 vierge), autopollinisés ($S_1S_1 \times S_1S_1$) et xéнопollinisés ($S_1S_1 \times S_2S_4$) après des temps de 0, 12, 18, 24, 33 et 48 heures de pollinisation ; les acides aminés des styles vierges sont identifiés et dosés soit dès le prélèvement de la fleur (0 h) soit 23, 33 et 48 heures après la cueillette des fleurs qui sont castrées et conservées, *in vitro*, dans les mêmes conditions que les fleurs pollinisées.

Les acides aminés sont analysés dans les mêmes conditions que précédemment.

a) Résultats expérimentaux.

Ils sont consignés dans les 3 volets des diagrammes de la figure 18 et montrent respectivement l'évolution des acides aminés des styles vierges, autopollinisés et xéнопollinisés à différents intervalles de temps.

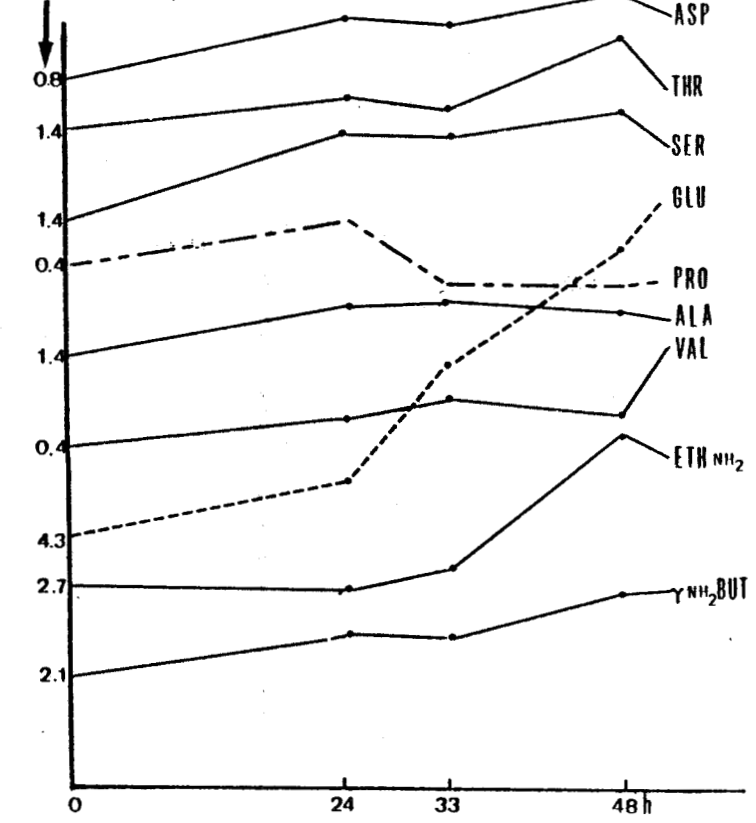
La comparaison entre les teneurs des différentes situations stylaires n'est significative qu'à la condition de tenir compte de l'apport des acides aminés du pollen, d'une part, et de la croissance des tubes polliniques, en xéнопollinisation, d'autre part ; dans ce dernier cas, la traversée du style s'effectue dans l'intervalle 24-36 heures.

Les diagrammes obtenus présentent les caractéristiques suivantes :

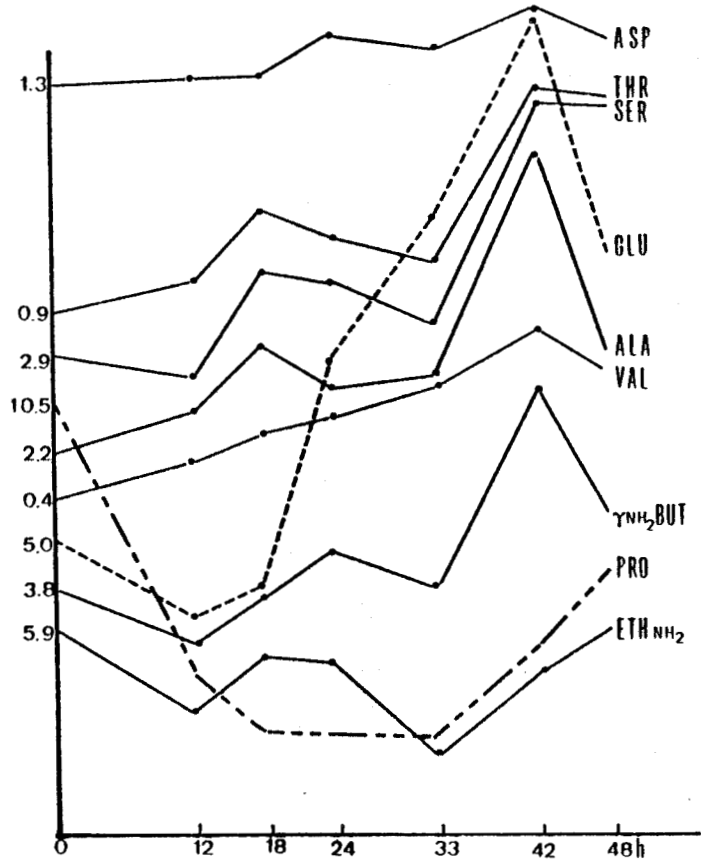
- 19 acides aminés sont identifiés ;
- parmi ces aminoacides, 10 sont présents à un taux très bas : ce sont le glycocolle, l'acide α aminobutyrique, l'isoleucine, la leucine, la tyrosine, la phénylalanine, l'ornithine, la lysine, l'histidine et l'arginine. Leur teneur dans le style varie très peu au cours du temps ; ces acides aminés mineurs semblent donc métaboliquement inactifs aussi bien dans le style vierge qu'au cours de la croissance ou du blocage du tube pollinique ;
- les 9 autres acides aminés présentent des variations importantes et semblent donc intervenir au cours de la période d'active croissance des tubes polliniques dans le style : ce sont la thréonine, la sérine, la proline, l'alanine, la valine, l'acide glutamique, l'éthanolamine, l'acide γ aminobutyrique et l'acide aspartique ; les différences concernent surtout l'acide glutamique et la proline ;
- des variations brusques apparaissent dans l'évolution des acides aminés "métaboliquement actifs" après des temps donnés : dans les styles pollinisés, le stade 12 heures constitue un point remarquable commun aux deux types compatible et incompatible ; le rassemblement des pics au temps 42 heures est notable pour le style autopollinisé ;
- plus précisément, on enregistre les variations individuelles suivantes :
 - .dans le style vierge une progression continue du taux d'acide glutamique de 0 à 48 heures et une augmentation faible pour l'acide aspartique, la sérine, la proline, l'alanine, la valine et l'acide γ aminobutyrique entre 0 et 24 heures ; une augmentation accusée de la thréonine, de l'éthanolamine entre 33 et 48 heures, moins prononcée pour l'acide aspartique, la sérine et l'acide γ aminobutyrique ;
 - .dans le style autopollinisé une augmentation de la thréonine, la sérine et l'alanine entre 0 et 18 heures suivie d'une légère diminution jusque 33 heures et un pic à 42 heures. Après ce temps, thréonine et sérine forment un palier alors que la teneur en alanine chute fortement. La valine a un comportement similaire à celui de l'alanine, mais beaucoup moins accusé. L'acide aspartique présente des variations de moindre amplitude mais suit une évolution du même type.
- L'acide γ aminobutyrique et l'éthanolamine suivent un schéma sensiblement analogue : diminution de 0 à 12 heures puis augmentation entre 12 et 24 heures, suivie d'une nouvelle chute jusque 33 heures et remontée à 42 heures.



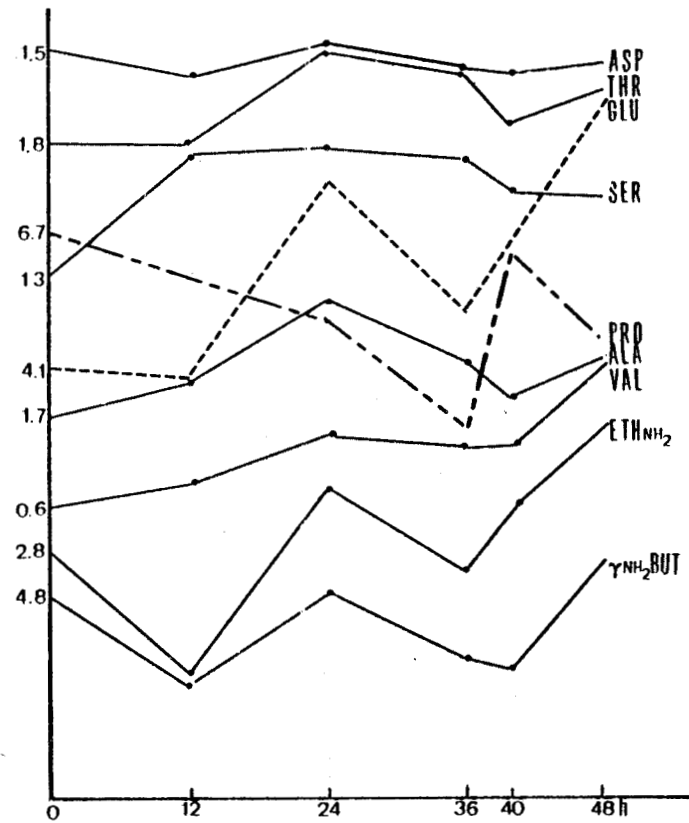
Teneur au départ, t = 0h
en nanomole/mg poids sec



STYLE VIERGE
S₁S₁



AUTOPOLLINISE
S₁S₁ x S₁



XENOPOLLINISE
S₁S₁ x S₂S₄

FIGURE 18 : SPECTRE DES ACIDES AMINES DANS LE STYLE D'ŒNOTHERA MISSOURIENSIS (LINDER ET LINSKENS, 1972).

L'acide glutamique voit son taux s'atténuer progressivement après 12 heures puis se relever jusqu'à un pic élevé à 42 heures.

La proline chute brutalement dans les 12 premières heures jusque 33 heures après une stabilisation à 18 heures, puis le taux remonte jusque 48 heures.

Le fait marquant dans le style autopollinisé est la formation d'un pic à 42 heures pour les acides aminés actifs : acide aspartique, acide glutamique, thréonine, sérine, alanine, valine, acide γ aminobutyrique.

Ce pic est l'expression d'une phase critique du métabolisme avec accumulation puis migration ou utilisation des acides aminés. C'est vraisemblablement la conséquence du blocage définitif des tubes polliniques incompatibles.

Dans le style xénopollinisé, thréonine, alanine, valine montent pour atteindre un sommet à 24 heures puis redescendent vers un minimum à 40 heures. L'acide aspartique varie peu et accuse faiblement le minimum à 40 heures. Le couple éthanolamine - acide γ aminobutyrique ainsi que l'acide glutamique varient avec 2 minima à 12 heures et 36-40 heures et un maximum de 24 heures ; par contre, la proline diminue du début jusqu'à 36 heures puis remonte pour former un pic à 40 heures, là où la plupart des autres acides aminés montrent un minimum.

b) Analyse des résultats et conclusion.

En résumé, le style vierge montre un nombre limité d'acides aminés libres en activité et la pollinisation n'en introduit pas de nouveaux ; après autopollinisation, ce sont encore les mêmes acides aminés qui sont en activité dans le métabolisme du style.

De plus, d'après ces résultats, on peut dire que le métabolisme propre du style vierge se manifeste très faiblement pendant les premières 24 heures et n'interfère donc pas avec la physiologie de croissance du tube pollinique.

Après pollinisation, il se présente une phase initiale commune aux 2 situations, compatible ou incompatible, pendant les 12 premières heures, avec une chute plus accentuée du taux de proline et d'acide glutamique en autopollinisation.

Au stade 24 heures, où s'achève la traversée du style par les tubes compatibles, correspond un point critique exprimé par un pic sur le graphique. En autopollinisation, la variation à ce même stade est amortie, mais

le taux d'augmentation reprend après 33 heures et le pic se situe à 42 heures. Les variations les plus importantes s'observent pour l'acide glutamique ; ces variations sont considérées comme liées au métabolisme énergétique.

La proline, apportée massivement par le pollen est utilisée de manière continue et régulière pendant la croissance des tubes incompatibles, elle ne s'accumule qu'après le passage des tubes dans l'ovaire ; dans le style le autopollinisé, elle est brutalement consommée dès le départ.

Une étude réalisée dans les mêmes conditions chez *Petunia hybrida* (LINSKENS et TUPY, 1966), aboutit aux résultats suivants : les styles vierges de *Petunia hybrida* subissent une dégradation protéique partielle, sensible au cours des premières heures qui suivent le prélèvement qui se traduit par une augmentation de la teneur en acides aminés libres et en particulier en amides. Ce fait s'observe également après le prélèvement de feuilles ou d'autres organes (KROTKOV, 1939 ; WEINSTEIN et PORTER, 1962) : une des raisons invoquées est le manque d'hydrates de carbone pourvoyeurs d'énergie qui sont remplacés par les acides aminés issus de la protéolyse.

Dans les styles pollinisés, notamment en autopollinisation, la quantité d'acides aminés formée par la dégradation des protéines est plus élevée que l'augmentation de la concentration des acides aminés. Cela signifie que les acides aminés résultant de la protéolyse sont consommés pour fournir de l'énergie.

Suivant l'hypothèse de STEWARD et BIDWELL (1961), il existerait 2 pools d'acides aminés différents ; un pool de stockage qui tire ses acides aminés des protéines : c'est la source de carbone pour la respiration et la production de CO_2 ; l'autre est un petit pool plus actif et qui fournit les acides aminés pour la synthèse protéique.

Les tubes polliniques qui effectuent leur croissance dans les styles ont une influence sur le spectre des acides aminés des styles. Les tubes polliniques doivent utiliser le pool des acides aminés du tissu stylaire comme substrat pour la fourniture d'énergie. Cependant, chez *Oenothera missouriensis* aucune perturbation spécifique du métabolisme des acides aminés dans la réaction d'incompatibilité ne peut être décelée.

D'autre part, certains aminoacides sont indispensables pour la croissance des tubes polliniques *in vitro* ; ex : le grain de *Paris hexaphylla* ne germe pas sur le milieu saccharose agar. En ajoutant de l'acide aspartique et glutamique, de l'histidine ou de la cystine dans le milieu, le grain de

pollen germe (SAWADA, 1958). Les résultats de cette étude ne permettent pas d'attribuer un rôle spécifique à ces aminoacides.

III - ANALYSE DES PROTEINES SOLUBLES

La connaissance de l'expression biochimique des allèles S s'avère indispensable pour préciser les mécanismes moléculaires qui interviennent dans l'établissement et le maintien de la barrière à l'autofécondation ; afin de déterminer s'il est possible d'isoler une ou plusieurs protéine(s) spécifique(s) d'un allèle S, nous avons précédé à l'extraction, la purification, l'identification et la comparaison des protéines du pollen ainsi que des styles vierges ou pollinisés en situation compatible ou incompatible.

a) Matériel et méthodes.

Le matériel biologique ainsi que la méthodologie utilisée pour la pollinisation ont été précisés précédemment. Après 15 heures de pollinisation, *in vitro*, les styles sont recueillis et congelés à -20°C .

Compte-tenu du matériel disponible à l'époque de l'expérimentation, l'étude a porté sur des extraits de styles vierges (S_1S_1), autopollinisés ($S_1S_1 \times S_1S_1$) et xéнопollinisés ($S_1S_1 \times S_2S_4$).

1-extraction des protéines : Toutes les opérations d'extraction sont effectuées rapidement pour éviter les dégradations.

Cependant, la préparation des extraits protéiques végétaux constitue une opération délicate ; le broyage des tissus met les protéines en contact avec des substances normalement isolées dans divers compartiments cellulaires, en particulier les acides vacuolaires, les enzymes hydrolytiques et oxydatifs, l'acide phytique et les tannins ; de plus, il peut y avoir adsorption des protéines solubles sur les fragments de paroi cellulaire. D'autre part, les composés phénoliques des plantes peuvent former des liaisons hydrogènes entre les phénols et les amides N substitués, donc avec les protéines. De plus, ces composés phénoliques peuvent être oxydés en quinones qui sont des composés hautement réactifs ; l'oxydation des phénols peut intervenir spontanément ou être catalysée par des phénoloxydases et peroxydases, enzymes largement distribués parmi les végétaux ; les quinones sont des agents oxydants et peuvent oxyder les groupements réactifs des protéines ; en outre, elles se polymérisent rapidement et se combinent irréversiblement, par une liaison covalente, aux protéines (LOOMIS-BATTAILE, 1966).

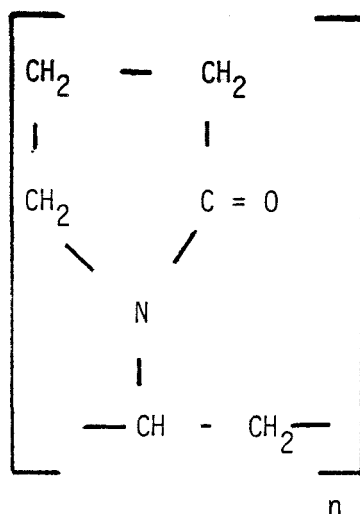
Chimiquement, les composés phénoliques végétaux sont très hétérogènes, la plupart appartient à l'un des deux groupes suivants :

- les flavonoïdes (comprenant les tannins) ;
- les dérivés de l'acide caféique et de l'acide gallique (composés en C₆-C₃ et C₆-C₁) (comprenant les tannins hydrolysables et la lignine).

Les flavonoïdes possèdent généralement des groupes hydroxyphénoliques comme sites réactifs ; les autres portent, en plus, des groupes carboxyliques libres ou estérifiés ; dans les deux types de composés, quelques groupes hydroxy sont substitués.

Des expériences de tannage avec du collagène ou des polymères synthétiques ont établi l'importance de la liaison peptidique ou amide dans la formation de complexes entre les tannins et les protéines. Les produits de condensation de type urée-formaldéhyde solubles dans l'eau et possédant la fonction CO-NH comme seul site réactif, précipitent les tannins en solution.

GUSTAVSON (1956) a établi que la polyvinylpyrrolidone, soit soluble, soit insoluble, forme des complexes stables insolubles avec les tannins.



Polyvinyl pyrrolidone

Certains solvants organiques capables de fournir une liaison hydrogène comme les alcools ou l'acétone peuvent également "détanner".

Des expériences de tannage, il est clair que seul le groupe CO - NH est requis pour la formation de complexes avec les tannins végétaux : les tannins formeraient des liaisons hydrogènes avec les liaisons amides, probablement à l'aide de l'oxygène du peptide.

Le pH a une influence sur le degré de liaison ; les tannins hydrolysables sont très fortement liés à pH 3-4 mais la liaison diminue au-dessus de pH 5 ; à pH 6, la quantité liée est d'environ 25 % de celle liée à pH 3 et seulement de 8 à 10 % pour un pH de 7,5.

Les effets de pH indiquent que les liaisons mettent en jeu l'ionisation des groupes hydroxyphénoliques pour les tannins condensés.

Dans le cas des tannins hydrolysables, les effets pH suggèrent que les liaisons hydrogène fortes sont formées par un groupe carboxylique non ionisé des tannins et que les liaisons H plus faibles par des groupes hydroxy-phénoliques non ionisés ; les tannins hydrolysables sont, de façon prédominante, les dérivés du pyrogallol (1,2,3 trihydroxybenzène) et le catéchol (O-dihydroxybenzène).

Des liaisons plus stables entre protéines et composés phénoliques peuvent exister, elles résultent de l'oxydation des phénols en quinones et de la copolymérisation des quinones avec les protéines.

L'oxydation enzymatique des phénols et les réactions des quinones avec les protéines ont été étudiées par MASON (1955), GUSTAVSON (1956) et BOUCHILLOUX (1963). Les phénoloxydases, libérées au cours des réactions d'extraction des protéines, sont particulièrement actives.

L'adjonction d'agents réducteurs tels que l'ascorbate ou les thiols au cours de l'extraction des enzymes ne prévient pas l'oxydation des phénols mais élimine rapidement les quinones formées interdisant leur accumulation et réduisant ainsi les possibilités de réaction avec les protéines. L'ascorbate réduit les quinones ainsi que les thiols qui forment des liaisons thioéthers ; cependant, les agents réducteurs peuvent être inefficaces voire nuisibles : il a été démontré qu'en présence d'oxygène les agents réducteurs activent l'orthohydroxylation des monophénols par la phénoloxydase ; parmi les phénols qui sont hydroxylés de cette façon, citons les résidus tyrosyl qui donnent naissance à des protéines modifiées induisant ainsi la possibilité d'un autotannage de la protéine via des intermédiaires quinonoïdes.

Le pH est donc un facteur important ; un pH faible permet d'éviter l'ionisation des phénols.

Les solvants organiques peuvent être également utilisés (ex : l'acétone).

2-protocole d'extraction : Pour tenir compte de toutes ces données et après de nombreuses tentatives infructueuses pour éliminer les pigments, le protocole suivant a été adopté :

Homogénéisation des styles et du pollen dans l'azote liquide (qui favorise le broyage des cellules et permet l'inactivation des enzymes "néfastes") en présence de tampon phosphate 0,01 M pH 4,5 contenant du métabisulfite de sodium (2 %), du mercaptoéthanol (1 %), de l'ascorbate de sodium (1 %) et de la polyvinylpyrrolidone (5 %). Le broyat est homogénéisé au Potter et centrifugé 30 minutes à 10 000 g. Le culot est éliminé et le surnageant dialysé 5 jours contre de l'eau distillée. La fraction adialysable est lyophilisée et conservée à -20°C. Les extraits des différents tissus obtenus se présentent sous forme d'une poudre brunâtre, légère et hygroscopique. C'est à partir de celle-ci que nous allons réaliser des différents essais d'électrophorèse.

L'extraction préalable à l'acétone ou la précipitation des protéines par le sulfate d'ammonium ou l'acide trichloracétique étant inopérante, nous avons abandonné ces techniques au profit de celle décrite ci-dessus.

3-étude électrophorétique (fiche technique n° 3) :

électrophorèse sur supports gélifiés :

α) électrophorèse en gel d'agarose de pH 8,2 : les résultats obtenus par électrophorèse en gel d'agarose de pH 8,2 sont peu satisfaisants. Une fraction importante ne migre pas dans le gel d'agarose et reste au niveau du dépôt.

β) électrophorèse en gel de polyacrylamide en disque : de la même façon, les résultats obtenus ne sont pas encourageants. Quelle que soit la concentration en polyacrylamide utilisée, les extraits restent au niveau du dépôt et on n'obtient par la coloration au bleu de Coomassie qu'une seule bande qui migre avec le front du solvant. La présence de pigments en quantité abondante, liés vraisemblablement sur les protéines extraites au cours du fractionnement est un écueil inévitable. L'utilisation de différentes techniques permettant l'élimination des pigments (PVP) n'a pas donné de résultats permettant une définition de protéines solubles par cette technique d'électrophorèse.

électrophorèse préparative en film liquide : l'électrophorèse préparative en film liquide donne un fractionnement satisfaisant à partir des extraits lyophilisés. Cette méthode offre en outre l'avantage de réaliser un temps préparatif permettant un fractionnement ultérieur des composants séparés (fiche technique n° 4).

b) Résultats.

1-*description des fractionnements obtenus :* Les 48 fractions séparées par électrophorèse préparative en film liquide sont soumises à une mesure d'absorption dans l'ultra-violet 278 mμ (correspondant au maximum d'absorption des protéines). La présence de glucides combinés est simultanément recherchée dans chaque fraction par dosage à l'orcinol d'une partie aliquote (fiche technique

n° 5). L'ensemble des courbes obtenues permet de tracer un diagramme utilisé pour la caractérisation des différents composants.

Nous rapportons dans la figure 19, les diagrammes obtenus pour les styles vierge, auto et xénopollinisés. La comparaison de ces 3 fractionnements nous a amené à retenir un découpage de l'ensemble des diagrammes en 5 fractions essentielles, numérotées de 1 à 5, de l'anode vers la cathode.

.la fraction F₁ : (tubes 1 à 7 pour les styles vierges et autopollinisés, 1 à 9 pour les styles xénopollinisés) présente dans les 3 cas étudiés un pic d'absorption très élevé à 278 m μ ainsi qu'après dosage à l'orcinol. Cependant, la présence de pigments en quantité abondante interfère dans l'absorption à 278 m μ avec les protéines (la fraction F₁ est fortement colorée en jaune brun). Le voisinage du compartiment des électrodes peut également interférer dans les dosages à l'orcinol.

Cette fraction sera ultérieurement décomposée par d'autres techniques.

.la fraction F₂ : n'est pas individualisée dans tous les cas ; elle correspond pour le style vierge au versant cathodique du pic F₁ ; une seule bande d'absorption, relativement faible, est décelée à 278 m μ , superposée à une teneur assez faible des oses liés.

Le style xénopollinisé présente, par contre, un pic unique avec un maximum d'absorption à 278 m μ élevé correspondant à un pic de dosage à l'orcinol : il s'agit vraisemblablement d'une glycoprotéine.

Le style autopollinisé est plus hétérogène : il présente deux maxima à 278 m μ et une faible teneur en oses liés.

Cette fraction F₂ est intéressante par la variabilité qualitative des teneurs en protéine des styles ayant subi les 2 types de pollinisations. Il nous a paru utile de poursuivre l'analyse de cette fraction.

.la fraction F₃ : n'apparaît pas clairement dans le cas du style vierge, elle a été prélevée pour comparaison avec les styles pollinisés qui montrent une fraction F₃ individualisée, surtout en incompatibilité où l'absorption à 278 m μ et après orcinol varient dans le même sens.

.la fraction F₄ : correspond au versant cathodique de F₃ pour le style vierge. Elle est très hétérogène pour S₁ x Bg et inexistante dans les extraits de styles incompatibles.

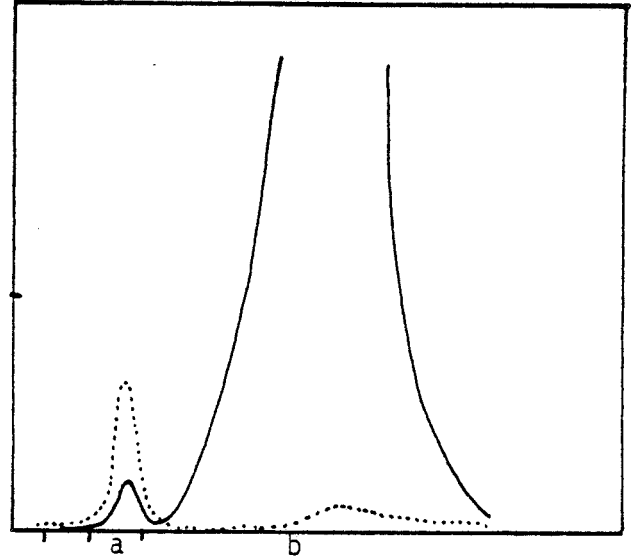
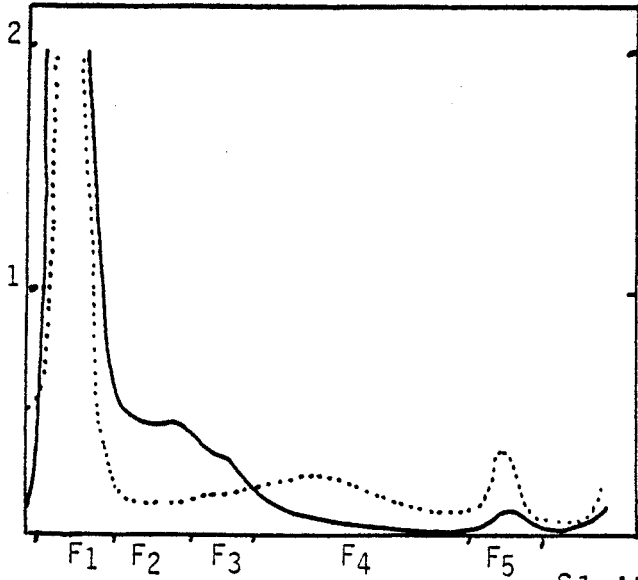
.la fraction F₅ : existe dans tous les cas ; très nettement individualisée pour S₁ v (278 m μ et orcinol), elle apparaît multiple et riche en glucides dans le cas compatible mais très faible en autopollinisation. Cependant cette fraction se situe en regard du point d'injection de la solution et

FIGURE 19 : FRACTIONNEMENT DES PROTÉINES STYLAIRES.
 (— : E 278 NM ; - - - - : ORCINOL).

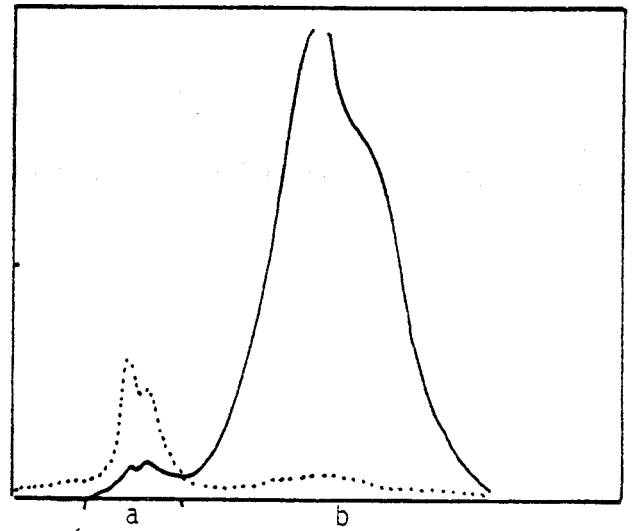
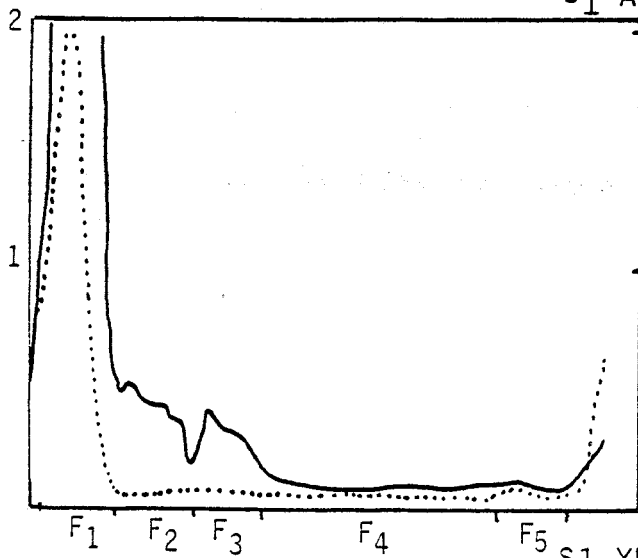
ELECTROPHORÈSE PRÉPARATIVE

CHROMATOGRAPHIE SUR SÉPHADEX
 G100 DE LA FRACTION F_{1B}

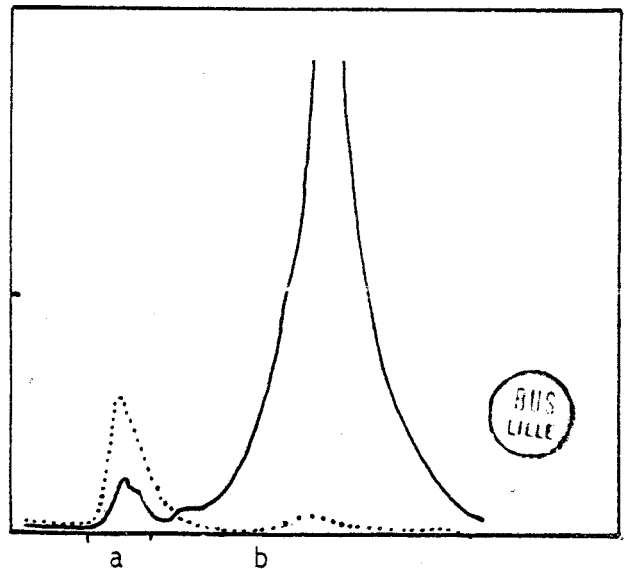
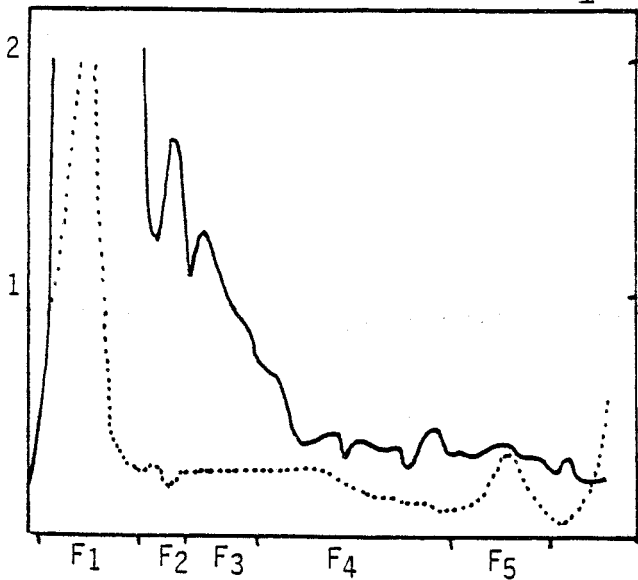
S₁ VIERGES



S₁ AUTOPOLLINISÉS



S₁ XÉNOPOLLINISÉS



correspond essentiellement à des polymères électriquement neutres. Cette fraction polyosidique est donc caractéristique des styles xénopollinisés.

La technique d'électrophorèse préparative s'avère donc précieuse pour la définition des protéines adialysables des styles puisque les diagrammes obtenus mettent en évidence des spectres très différents entre les styles vierges, auto et xénopollinisés.

Il apparaît particulièrement important de comparer entre eux les styles pollinisés ; la fraction F_2 présente deux maxima d'absorption à 278 m μ dans le style autopollinisé alors qu'en situation compatible on n'observe qu'un seul pic (lié d'ailleurs à un épaulement dans le dosage à l'orcinoïl traduisant l'apparition d'une glycoprotéine).

Par ailleurs, la xénopollinisation se traduit au niveau du style par une abondante production de protéines chargées positivement.

Chaque fraction est ensuite dialysée pendant 5 jours contre de l'eau distillée puis lyophilisée en vue d'une analyse ultérieure.

2-étude des fractions séparées en électrophorèse préparative : Afin de préciser les variations observées dans les diagrammes obtenus par électrophorèse en film liquide, nous avons tenté de définir le comportement des composants majeurs par électrophorèse de zone ; cependant, les supports d'électrophorèse utilisés (acétate de cellulose et gel de polyacrylamide) n'ont pas permis une bonne résolution.

Ceci nous a conduit à rechercher un autre protocole de fractionnement fondé à la fois sur les différences de points isoélectrophorétiques des protéines et sur leurs tailles moléculaires ; pour cela, les fractions F_1 à F_5 sont dialysées 5 jours contre l'eau distillée puis à nouveau lyophilisées et purifiées par passage sur colonne de biogel P₁₀.

déminéralisation sur colonne de Biogel P₁₀ (fiche technique n° 6) : les différentes fractions lyophilisées contiennent encore une partie importante de sels minéraux provenant des solutions tamponnées utilisées en électrophorèse, malgré la dialyse. Ces sels sont éliminés par chromatographie sur colonne de Biogel P₁₀ en suspension dans l'eau distillée.

Les hétéroprotéides qui nous intéressent sont élués au volume mort de la colonne, alors que les sels, retenus dans les pores du gel, ne sortent de la colonne que plus tardivement.

.chromatographie sur colonne de Séphadex G100 : les diverses fractions F_1 sont concentrées à nouveau par lyophilisation et déposées sur une colonne de Séphadex G100 équilibrée avec un tampon phosphate 0,1 M pH 7,0. L'éluat est recueilli par fractions de 5 ml et analysé par absorption à 278 m μ et par dosage à l'orcinol.

Par cette technique, des protéines sont dissociées des pigments. Les fractions obtenues sont à nouveau dialysées et lyophilisées.

3-résultats du fractionnement (figure 19) :

.styles vierges : la fraction F_1 après dessalage sur biogel P_{10} est chromatographiée sur Séphadex G100 : deux pics distincts sont mis en évidence par absorption à 278 m μ et après dosage à l'orcinol ; le premier, individualise un type de glycoprotéine $F_{1,a}$; le second pic, énorme, correspond essentiellement aux pigments extraits, liés sans doute à des protéines ; cette fraction $F_{1,b}$ est éluée plus tardivement.

La fraction $F_{1,a}$ est recueillie séparément, soumise à une dialyse contre l'eau distillée et lyophilisée. La poudre qui en résulte est ensuite dissoute dans un petit volume de tampon (Tris 0,1 M, NaCl 0,2 M, pH 8,0) puis chromatographiée sur colonne de Sépharose 4B (figure 20).

Le diagramme d'éluion présente un pic d'absorption à 278 m μ appelé $F_{1,a}$; la fraction isolée par chromatographie sur Séphadex G100 n'est donc pas dissociable sur le gel de Sépharose 4B ; il s'agirait donc d'une glycoprotéine unique.

.styles autopollinisés : la même séquence de préparation et de chromatographie de la fraction F_2 provenant des styles autopollinisés permet, après passage sur Séphadex, la caractérisation de 2 pics ; l'un $F_{1,a}$, présente 2 maxima d'absorption tant à 278 m μ qu'après dosage à l'orcinol ; il est suivi par la fraction correspondant aux pigments $F_{1,b}$; la séparation de 2 constituants de la fraction $F_{1,a}$ n'étant pas suffisante, celle-ci est récupérée, dialysée, lyophilisée et chromatographiée sur Sépharose 4B.

Le diagramme obtenu après éluion et collection par fractions de 5 ml met en évidence un seul pic d'absorption à 278 nm ; la séparation des 2 composants de la fraction $F_{1,a}$ n'est pas réalisée sur Sépharose 4B.

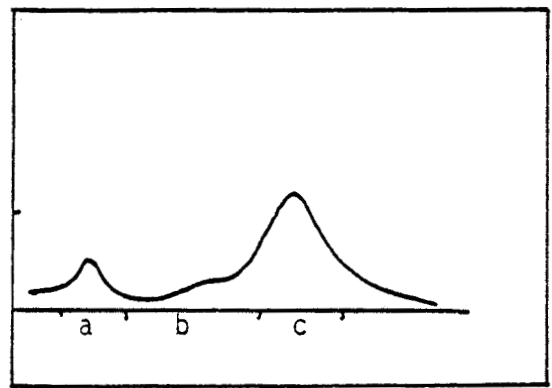
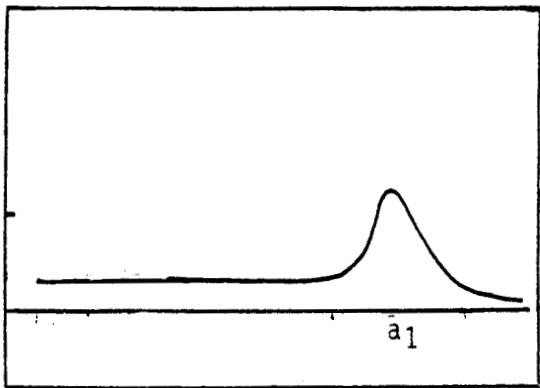
.styles xéno-pollinisés : après passage sur Biogel et gel de Séphadex G100, la fraction F_1 issue de l'électrophorèse préparative présente également 2 pics ; l'un F_1 apparaît hétérogène à 278 nm mais non à l'orcinol, l'autre $F_{1,b}$ correspondant aux protéines liées aux pigments.

FIGURE 20 : SÉPARATION DES FRACTIONS F_1A ET F_4 PAR
 CHROMATOGRAPHIE DE GEL FILTRATION
 (ABSORPTION À 278 NM).

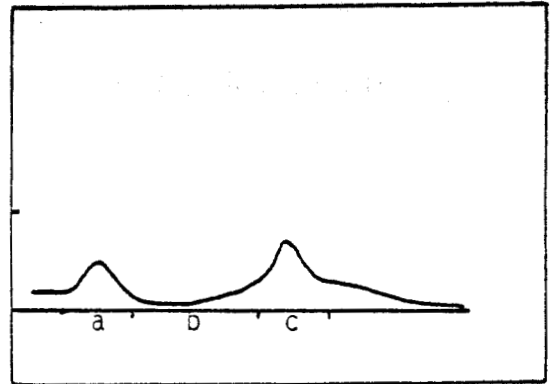
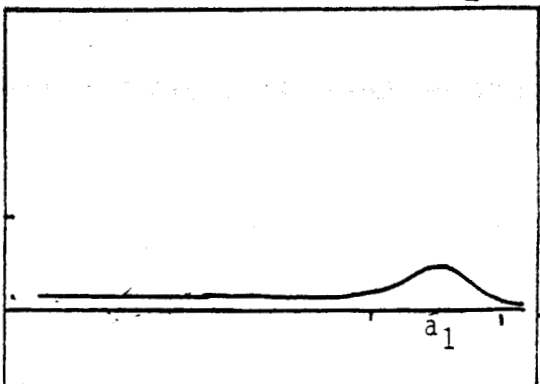
CHROMATOGRAPHIE SUR SÉPHAROSE
 4B DE LA FRACTION F_1A

CHROMATOGRAPHIE SUR BIOGEL
 P10 DE LA FRACTION F_4

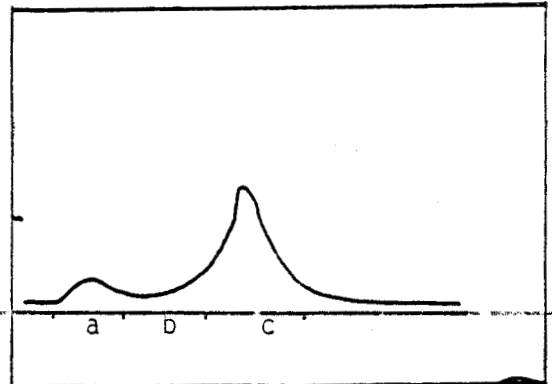
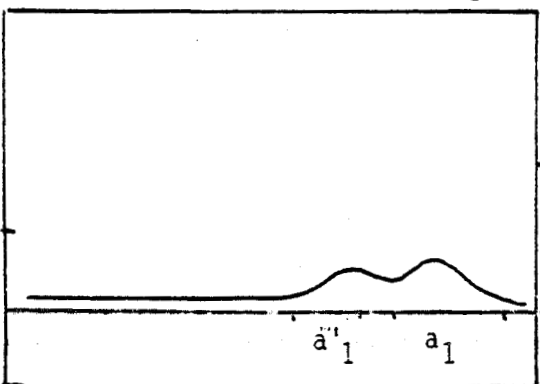
S_1 VIERGES



S_1 AUTOPOLLINISÉS



S_1 XÉNOPOLLINISÉS



La fraction F_1a chromatographiée sur Sépharose 4B permet l'identification de 2 protéines : à côté du pic F_1a_1 trouvé dans les 2 cas précédents, une nouvelle fraction $F_1a'_1$ apparaît comme caractéristique du style xénopollinisé.

La comparaison des diagrammes issus de la chromatographie de la fraction F_1 (la plus importante, pondéralement, après électrophorèse préparative) permet donc de mettre en évidence une différence dans la structure protéique des styles suivant qu'ils ont subi ou non la pollinisation, compatible ou incompatible. Il existe dans tous les styles une protéine caractéristique de haut poids moléculaire que l'on retrouve dans tous les cas (F_1a_1) ; en cas de xénopollinisation, une protéine nouvelle apparaît. Celle-ci est absente après pollinisation incompatible.

L'hétérogénéité de la fraction F_4 , obtenue après électrophorèse préparative (styles xénopollinisés), et la présence d'un pic au cours du dosage à l'orcinol pour les styles vierges nous a conduit à poursuivre l'analyse chromatographique de ces fractions. Le passage des fractions F_4 sur Biogel P_{10} (figure 20) met en évidence des spectres protéiques différents dans les styles vierges, autopollinisés et xénopollinisés ; la trop faible teneur en protéine obtenue après séparation de ces fractions et lyophilisation ne nous a pas permis de poursuivre plus avant l'analyse.

Par ailleurs, l'électrophorèse préparative en film liquide des protéines des styles vierges, autopollinisés et xénopollinisés, présente des différences considérables dans la répartition des protéines stylaires. En particulier, le style xénopollinisé montre un spectre protéique très complexe par rapport au style vierge, qui met en évidence le bouleversement considérable apporté par la pollinisation. L'apport du tube pollinique est important mais avec la technique utilisée, on ne peut distinguer les protéines stylaires et celles appartenant en propre au tube pollinique.

Ces résultats sont à rapprocher de ceux obtenus dans les mêmes conditions expérimentales chez *Petunia hybrida*.

En effet, LANIEZ (1969) a mis en évidence une nette particularité de composition des extraits de styles autopollinisés par rapport aux styles xénopollinisés : l'incompatibilité de fécondation se traduisant par la disparition de 2 protéines que l'on retrouve dans les styles vierges et xénopollinisés.

Ces résultats ne sont pas conformes à ceux observés sur *Oenothera missouriensis*. Cependant, il reste à le démontrer car la fraction protéique la plus importante extraite des styles d'*Oenothera* est liée à des pigments, vraisemblablement

dès l'extraction et n'est donc pas analysable. Les autres protéines, obtenues en quantité trop peu importante présentent des analogies. Seul le style xénopollinisé se distingue par l'apparition d'une protéine supplémentaire ; cependant la trop petite quantité de substance obtenue ne permet pas d'en établir la composition chimique que ce soit pour la composition en acides aminés ou en oses. Pour pouvoir être plus fiable, l'expérimentation requiert une plus grande quantité de matériel de départ et des techniques d'extraction évitant la liaison entre les protéines et les pigments : des tentatives ont d'ailleurs été faites dans ce sens (utilisation de polyvinylpyrrolidone, ascorbate de sodium, mercaptoéthanol dans le tampon d'extraction, précipitation au sulfate d'ammonium ou au TCA) mais sans succès.

Les extraits F₁ à F₅, soumis à l'électrophorèse sur gel de polyacrylamide n'ont pas fourni de séparations probantes : pour chacune des fractions et chacun des cas, on n'observe en général qu'une seule bande (après coloration au bleu de Coomassie) qui correspond au front de migration.

c) Conclusions des études réalisées sur les protéines des styles.

Nos tentatives d'isolement et de caractérisation des protéines extraites des styles d'*Oenothera missouriensis* nous conduisent à des conclusions prudentes sur les différences observées dans l'incompatibilité de fécondation. Le plan de fractionnement utilisé, au contraire, s'avère susceptible de conduire à l'isolement et à l'identification de glycoprotéines végétales spécifiques.

Les composants majeurs des préparations semblent se rattacher à des substances de nature glycoprotéique : la superposition des courbes obtenues, par lecture à 278 m μ et par dosage des oses à l'orcinol, après fractionnements électrophorétique et chromatographique, le laisse supposer ; de même la coloration par l'acide périodique - réactif de Schiff au niveau des zones colorées par ailleurs à l'amidoschwartz, renforce cette hypothèse.

La spécificité de structure des protéines du style vierge ou après xénopollinisation ne peut être affirmée définitivement qu'après une analyse plus fine des protéines isolées, en particulier par une étude de leurs propriétés d'antigénicité spécifique.

La présence de glycoprotéines métaboliquement actives dans le tissu conducteur au cours de la croissance du tube pollinique nécessite la présence de glycannes hydrolases. Ces enzymes responsables de la dégradation récurrente des chaînes de glycannes ont déjà été caractérisés dans le règne

végétal (chez *Phaseolus vulgaris*, BAHL et AGRAWAL, 1968 et chez *Petunia hybrida*, LINSKENS et coll., 1969). Une connaissance précise de ces enzymes et de leur activités au cours des différents types de pollinisation serait donc susceptible de confirmer l'existence d'un métabolisme actif des glycoprotéines du style après pollinisation.

IV - ACTIVITES DES GLYCANNES HYDROLASES DANS LES EXTRAITS DE STYLES ET DE POLLEN

L'importance des mécanismes enzymatiques dans la pénétration et la croissance du tube pollinique a fait l'objet d'études précises dans le cas de l'autoincompatibilité de type sporophytique : l'inhibition de croissance se localise alors à la surface des papilles stigmatiques. L'introduction directe du pollen dans les tissus du style, sans contact stigmatique, aboutit à la nouaison même après autopollinisation ; KROH (1967) a démontré que le tube pollinique compatible, pour pénétrer dans la paroi des papilles et/ou cheminer entre les cellules du stigmate, a besoin d'au moins 3 systèmes enzymatiques lysant la cutine, la cellulose et la pectine ; le dépôt d'un grain de pollen sur un stigmate compatible est suivi de l'activation de la cutinase de la microspore ; sous l'effet de cet enzyme, la cuticule devient perméable et le grain peut germer en absorbant l'eau de la vacuole papillaire ; le tube pollinique poursuit sa croissance dans les structures celluloses des parois de la papille. Si, au contraire, le grain de pollen est au contact d'un stigmate incompatible, la cutinase n'est pas activée et la germination n'a pas lieu.

Ces résultats démontrent l'importance des mécanismes d'inhibition et d'activation enzymatiques dans la croissance du tube pollinique. Dans le cas de l'autoincompatibilité gamétophytique, le ralentissement de la croissance et le blocage apparaissent à l'intérieur du style : les tubes polliniques incompatibles sont identifiables par quelques caractéristiques : extrémités renflées, parois épaissies, augmentation des dépôts de callose, apparition fréquente de ramifications (LINSKENS et ESSER, 1957 ; SCHLÖSSER, 1961, TUPY, 1961).

La détermination gamétophytique, commandée par l'allèle S du tube pollinique fait également appel à la régulation de systèmes enzymatiques spécifiques : après la pollinisation, une interaction métabolique intense apparaît entre le tube pollinique d'une part et les cellules du tissu conducteur du style d'autre part (LINSKENS et TUPY, 1966). Des enzymes diffusent du tube pollinique, une dégradation lente des protéines du style apparaît. Le tissu

conducteur fournit non seulement l'eau et les substrats nécessaires à la croissance du tube pollinique, mais aussi des enzymes nécessaires à l'activité métabolique locale : il se produit dans les heures qui suivent une pollinisation compatible, une augmentation nette d'activités enzymatiques spécifiques : glutamo-déshydrogénases, aspartate carbamyl transférases, cétose 1 phosphate aldolase, alanine aminotransférase et citrate synthétase. Inversement, une baisse des phosphatases acides est enregistrée après pollinisation croisée (ROGGEN, 1967).

Chez *Petunia hybrida*, l'utilisation de l'électrophorèse sur gel de polyacrylamide ou la chromatographie sur colonne de DEAE-cellulose ont permis à ROGGEN de définir les isozymes de la glutamo-déshydrogénase et de démontrer leur spécificité génétique en rapport avec les allèles S. De plus, au cours d'expériences d'incorporation aux extraits enzymatiques du style (S_1S_2) d'extraits de pollen issu d'un allèle différent (S_3), il met en évidence l'activation de la glutamo-déshydrogénase par une substance adialysable présente dans l'extrait pollinique.

De façon similaire aux travaux publiés chez *Petunia hybrida* (LINSKENS et coll., 1970), l'étude biochimique des styles d'*Oenothera missouriensis* nous a conduit à la caractérisation et à l'isolement de fractions ayant le caractère de glycoprotéides ; nous avons donc recherché les activités des glycanes hydrolases, enzymes catalysant la dégradation récurrente des chaînes de glycanes intervenant dans la structure de ces hétéroprotéides.

Les travaux de LINSKENS (1961) ont en effet mis en évidence l'apparition de substances de nature callosique dans la paroi du tube pollinique en situation incompatible. Il semble que ces substances déposées sont au contraire utilisées lors de la pollinisation compatible et peuvent alors servir à l'édification du tube pollinique qui progresse vers l'ovule.

Les glycanes hydrolases sont recherchées dans les extraits de style et les extraits de pollen par leur activité sur des substrats synthétiques, les paranitrophénylgycosides correspondants (FINDLAY et coll., 1958). Après avoir étudié leur pH optimum d'action, nous comparons les activités spécifiques dans les différents extraits (BRIS, 1974).

a) Identification des glycanes hydrolases.

L'utilisation de substrats synthétiques (cf. fiche technique n° 7) nous a permis d'identifier dans les extraits de style et de pollen une

α galactosidase, une β galactosidase, une α mannosidase, une N acétyl gluco-
saminidase et une N acétyl β galactosaminidase.

b) Détermination du pH optimum d'action des glycanes hydrolases.

Pour chaque extrait nous avons déterminé l'activité spécifique sur une série de 8 dosages réalisés dans les mêmes conditions (température, volume et temps d'incubation) en faisant varier les valeurs du pH de la solution de 0,5 en 0,5 unités pH. Les activités sont exprimées en "unités enzymatiques". Celles-ci sont définies comme la quantité d'enzyme qui libère, à partir du paranitrophényl-glycoside correspondant à l'activité recherchée, une nanomole de paranitrophénol par minute, à la température de 25°C.

Les résultats nous amènent à retenir pour l'étude des glycanes hydrolases les pH optima d'action suivants :

- α galactosidase..... 5,5
- β galactosidase..... 4,5
- α mannosidase..... 4
- N-acétyl β glucosaminidase..... 4
- N-acétyl β galactosaminidase..... 4

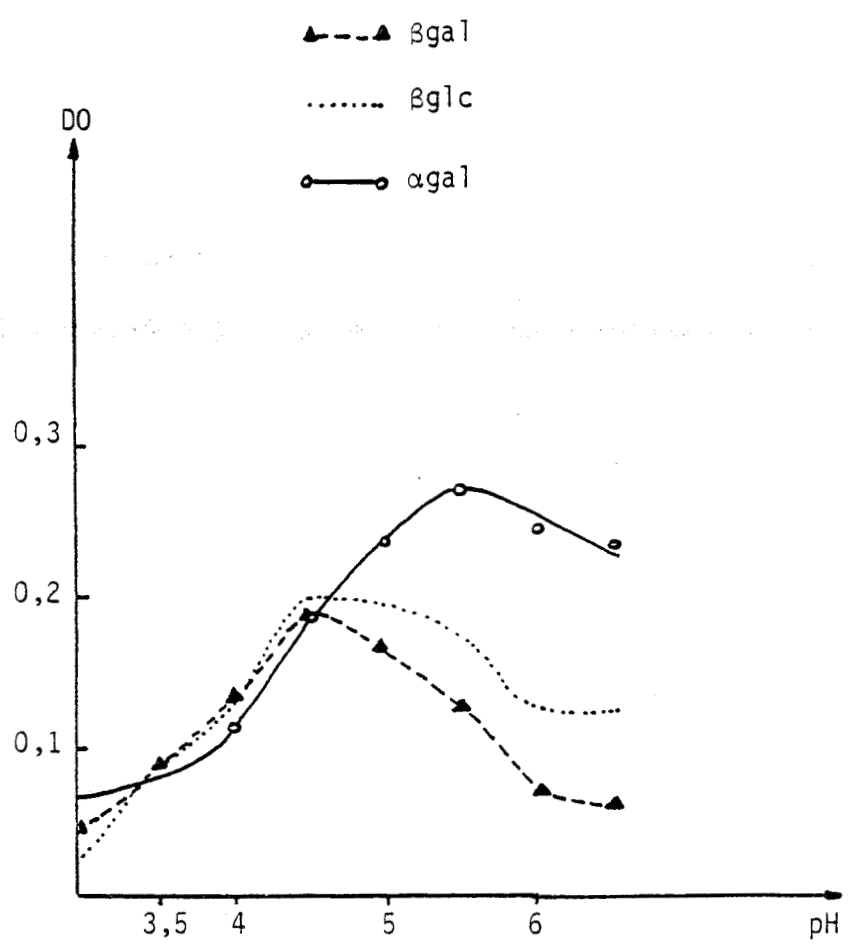
Quelques-unes des courbes d'activité en fonction du pH sont rapportées figure 21.

c) Résultats (BRIS, 1974).

1-activités enzymatiques du pollen : Elles sont exprimées en unités spécifiques : une unité correspond à la quantité de paranitrophénol, en nanomoles, libérées à 25°C par milligramme de protéine (fiche technique n° 8). On obtient les résultats suivants pour le pollen des 3 géotypes étudiés :

	S ₁	Bb	Bg
α galactosidase	46	29,7	38
β galactosidase	180	408,2	200
α mannosidase	25	25,1	22
N-acétyl β glucosaminidase	430	228	310
N-acétyl β galactosaminidase	180	114	170

FIGURE 21 : PH OPTIMUM D'ACTION DES GLYCANNES-HYDROLASES DES STYLES AUTOPOLLINISÉS (BB).



BIIS
LILLE

2-activités enzymatiques du style : Nous ne pouvons rapporter que les mesures d'activité relatives aux styles de la plante Bb (S_1S_2), le seul clône dont nous disposions en quantité suffisante au moment de l'expérimentation.

Les résultats exprimés en unités spécifiques sont les suivants :

	Bb autopol. ($S_1S_2 \times S_1S_2$)	Bb x Bg ($S_1S_2 \times S_2S_4$)	Bbv S_1S_2
α galactosidase	60	144	53
β galactosidase	38	60	27
α mannosidase	8	16	16
N-acétyl β glucosaminidase	16	28	21
N-acétyl β galactosaminidase	15	22	10

d) Activité des glycanes hydrolases au cours de la germination du pollen *in vitro*.

1-mise au point d'un milieu de culture : Les conditions optimales de germination et de croissance du pollen d'*Oenothera missouriensis in vitro* ont été établies par modification du milieu de base : saccharose 8 %, acide borique 0,01 %, extrait de levure 0,1 % (SAWADA, 1958).

Les paramètres sur lesquels ont porté les modifications sont le pourcentage de saccharose et l'adjonction de substances connues pour favoriser la croissance des tubes polliniques (calcium, EDTA, myoinositol, acides aminés) ; de plus, 2 types de milieux ont été testés : solides (gélatinés à 5 %) et liquides (en boîtes de Pétri, ou dans un appareil à germination).

Dans tous les cas, il faut tenir compte pour l'établissement des pourcentages de germination, de la présence de grains vides, incapables de germer. Ces grains de pollen sont facilement reconnaissables car ils sont plus petits que les grains normaux et moins colorés.

Nous avons donc établi un milieu de culture favorable puisqu'il assure la germination la plus importante et la meilleure croissance des tubes polliniques. Sa composition est la suivante.

- saccharose.....	8 %
- H_3BO_3	0,01%
- extrait de levure.....	0,1 %
- $Ca (NO_3)_2$	300 ppm

2-dosage des activités enzymatiques : Pollen et tubes polliniques récupérés par centrifugation (10 minutes à 700 g), sont broyés au mortier dans de l'azote liquide puis homogénéisés au Potter dans un tampon (tampon phosphate 0,01 M pH 5,0, métabisulfite de sodium 2 %, ascorbate de sodium 0,25 M, PVP Kollidon K₉₀ 1 %) ; après centrifugation 30 mn, 10 000 g, le culot est éliminé et le surnageant dialysé 4 jours contre l'eau distillée. Les dosages enzymatiques sont effectués à l'aide des paranitrophényl-glycosides correspondants.

3-évolution des activités enzymatiques en fonction du temps de germination :

Les résultats suivants, exprimés en activités spécifiques en fonction du temps ont été obtenus à partir des tubes polliniques provenant du pollen S₁.

	30mn	1 h	2 h	3 h	4 h
α galactosidase	62	84	104	148	147
β galactosidase	195	219	227	270	320
α mannosidase	40	46	130	111	125
N-acétyl β glucosaminidase	439	463	472	506	554
N-acétyl β galactosaminidase	186	244	254	280	305

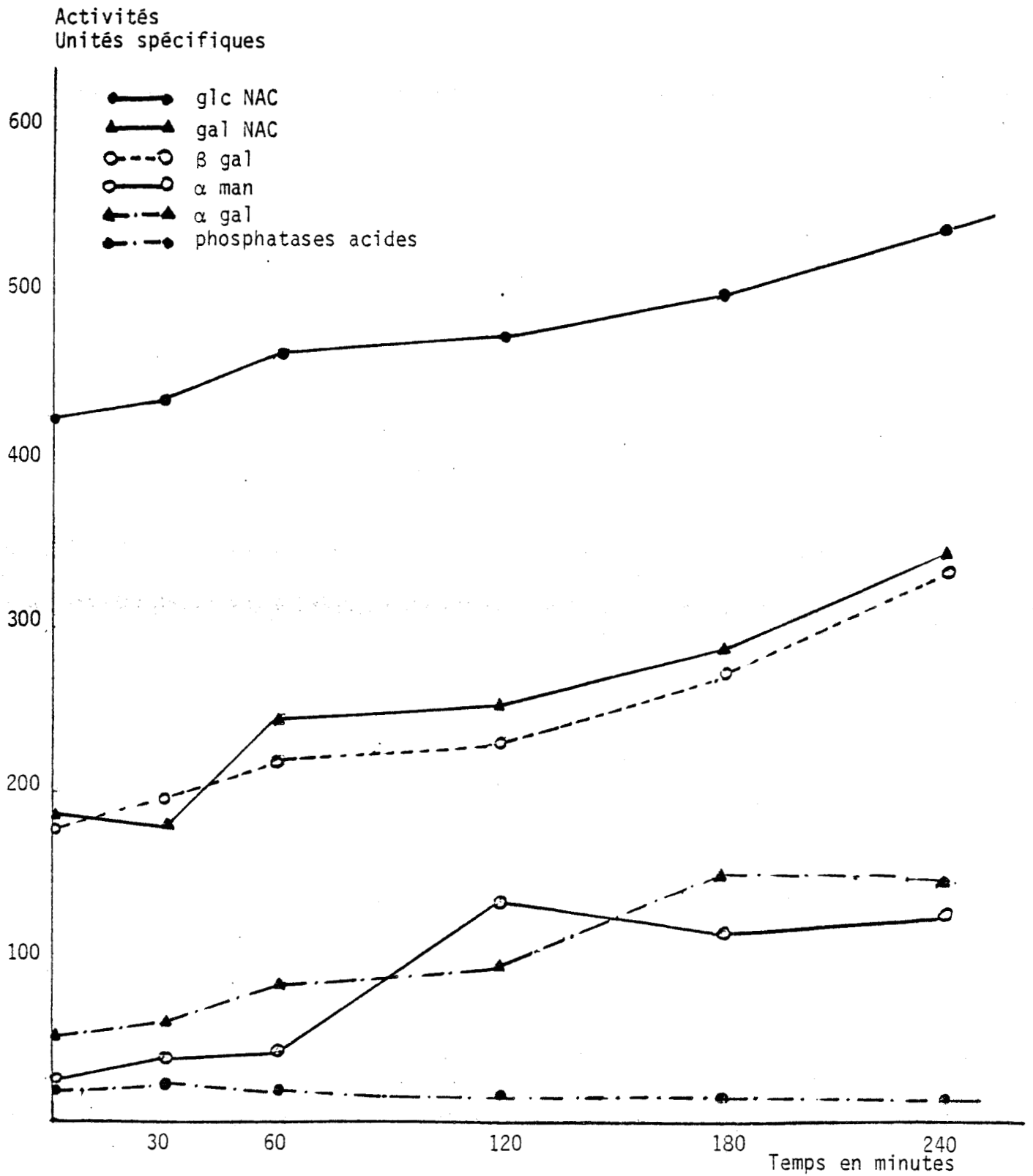
Une élévation régulière d'activité apparaît pour toutes les glycanes hydrolases envisagées (figure 22) ; parfois, une augmentation d'activité importante est sensible mais est localisée dans le temps : entre 30 et 60 minutes pour la N-acétyl β galactosaminidase et entre 1 et 2 heures pour l'α mannosidase.

Après 4 heures de germination, l'activité de l'α mannosidase est multipliée par 5 et celle de l'α galactosidase par 3, celle des autres enzymes est augmentée à un facteur de l'ordre de 1,5.

e) Conclusions sur les activités enzymatiques.

1-activités glycanes hydrolases du pollen des différents génotypes : L'analyse comparative des activités enzymatiques étudiées met en évidence des différences de comportement : l'α galactosidase, l'α mannosidase et la N-acétyl β galactosaminidase présentent des activités comparables quel que soit l'allèle S porté (S₁, S₂ ou S₄). Par contre, pour la β galactosidase, le pollen issu du clone Bb (S₁S₂) a une activité double de celle décelée dans le pollen issu de S₁ (S₁S₁) ou Bg (S₂S₄) ; pour la N-acétyl β glucosaminidase, le clone S₁ présente la particularité d'avoir une activité élevée.

FIGURE 22 : EVOLUTION DES ACTIVITÉS ENZYMATIQUES SPÉCIFIQUES ENREGISTRÉES AU NIVEAU DU TUBE POLLINIQUE AU COURS DE LA GERMINATION.



Ces résultats ne sont pas interprétables à ce stade de l'étude ; on ne peut relier directement une activité glycanne hydrolase à la présence d'un allèle S particulier.

2-comparaison pollen-style : Elle n'a pu être réalisée, pour des raisons de quantité de matériel disponible, que sur le clône Bb (S₁S₂).

Le style vierge présente généralement une activité glycanne hydrolase (exprimée en unités spécifiques) beaucoup plus faible que celle du pollen porteur des mêmes allèles S, exception faite de l' α galactosidase.

La pollinisation amène une modification, importante parfois, des activités spécifiques de certaines glycannes hydrolases :

- la pollinisation incompatible induit une diminution de l'activité de l' α mannosidase ;

- la xénopollinisation, dans ce cas demi-compatible, se traduit par une augmentation considérable de l'activité α galactosidasique (3 fois celle du style vierge), de la β galactosidase et de la N-acétyl β galactosaminidase) (2 fois l'activité du style vierge).

Les variations observées ne peuvent traduire une simple addition des activités enzymatiques du style et des tubes polliniques : au cours de la germination du pollen, on constate une augmentation régulière de toutes les activités glycanne hydrolases ; or, la pollinisation a parfois pour conséquence une activité enzymatique identique dans le style vierge et le style pollinisé (c'est le cas pour l' α mannosidase) alors que l'activité mesurée dans les tubes polliniques pour cet enzyme est très fortement augmentée au cours de la germination. On peut donc penser que les activités enzymatiques sont adaptées aux conditions du métabolisme local nécessaire à la croissance ou à l'arrêt du tube pollinique.

Cependant, les résultats des dosages enzymatiques obtenus, s'ils sont globalement intéressants, présentent quelques incertitudes : l'activité spécifique de chaque enzyme étudié ne peut être déterminée avec la précision souhaitable, compte-tenu de la présence abondante de pigments liés aux protéines extraites ; la localisation électrophorétique des activités enzymatiques qui aurait permis une meilleure appréhension des résultats est, pour les mêmes raisons, rendue impossible. De plus, il aurait été intéressant d'isoler la ou les protéines que les allèles S produisent théoriquement ; les résultats obtenus permettent en effet de mettre en évidence l'apparition de pics à 278 nm dans les styles ayant subi les pollinisations compatible et incompatible. Il aurait donc été utile de définir et de caractériser par les critères habituels ces différentes protéines. La liaison avec des pigments au cours des processus

d'extraction ne permet malheureusement pas, avec les techniques utilisées et malgré de nombreuses tentatives, d'aller plus avant dans l'analyse. Devant l'impossibilité de résoudre ces problèmes, nous avons dû nous orienter vers la définition et l'analyse d'une autre catégorie de constituants cellulaires : les phospholipides et les glycosphingolipides.

V - LES PHOSPHOLIPIDES ET L'INCOMPATIBILITE DE FECONDATION

La croissance des tubes polliniques dans le tissu conducteur du style déclenche des réactions physiologiques dont nous avons mis en évidence quelques aspects dans les paragraphes précédents. Ces réactions aboutissent au rejet de l'autotube ou permettent la traversée du style dans le cas compatible. Quelle que soit la réponse, ces phénomènes nécessitent des échanges importants. Il apparaît, en effet, que la croissance du tube pollinique préalable à la fécondation, nécessite une perméabilité des membranes et l'adaptation de systèmes enzymatiques exactement adaptés aux processus biochimiques locaux (HAVEZ, 1967).

Or, les phospholipides sont des constituants essentiels des systèmes membranaires et toute altération ou simple différence dans la composition en phospholipides des membranes peut avoir un effet sur la perméabilité et par la même, sur la croissance du tube pollinique. De plus, la conformation et l'activité enzymatique des protéines membranaires peuvent être modifiées par les phospholipides. Il est donc important de définir les phospholipides entrant dans la composition des styles et du pollen d'*Oenothera missouriensis*, d'analyser leur structure et d'étudier leur évolution au cours du phénomène d'autoincompatibilité de fécondation.

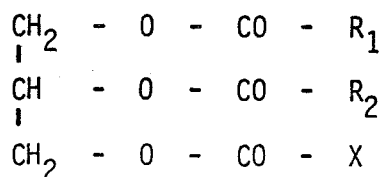
Après la description des principaux phospholipides végétaux et leur localisation, nous analyserons les différentes fonctions connues de ces composants. Les résultats expérimentaux nous permettront ensuite de faire des hypothèses sur le rôle des phospholipides dans la réaction de rejet.

a) Structure et répartition des phospholipides.

Les phospholipides (glycérophosphatides, phosphoinositides, phosphosphingosines) entrent dans la constitution des membranes de toute

cellule vivante : cette catégorie de lipides n'est donc pas particulière au règne végétal.

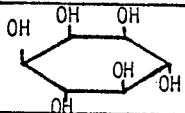
Les deux premiers groupes cités ont pour formule générale :



R₁ et R₂ sont des restes aliphatiques.

Le tableau 23 suivant répertorie les principaux phospholipides et leur localisation.

Tableau 23 : localisation des principaux phospholipides.

X	Nom	Abréviation	Localisation ou fonction	Références bibliographiques
H	Acide phosphatidique	AP	intermédiaire métabolique (peu abondant)	
$-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\overset{+}{\text{N}}-(\text{CH}_3)_3$	Phosphatidylcholine ou lécithine	PC	constituant des membranes plasmiques réticulum endoplasmique	De GIER et Van DEENEN (1961)
$-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}_2$	Phosphatidyléthanolamine ou céphaline	PE	constituant des membranes plasmiques non chloroplastiques membranes bactériennes	BOMSTEIN (1968) DAWSON (1969) ANEJA (1969)
$-\text{CH}_2-\underset{\text{COOH}}{\underset{ }{\text{CH}}}-\text{NH}_2$	Phosphatidylsérine	PS	intermédiaire métabolique (peu abondant)	BENSON et MARUO (1958) BENSON et STRICKLAND (1960)
$-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{OH})-\text{CH}_2\text{OH}$	Phosphatidylglycérol	PG	chloroplaste	BENSON et MARUO (1958)
$-\text{CH}_2-\underset{\text{O}}{\underset{ }{\text{CHOH}}}-\text{CH}_2-\underset{\text{O}}{\underset{ }{\text{P}}}-\text{O}-\underset{\text{O}}{\underset{ }{\text{C}}}-\text{CH}(\text{R}_4)-\underset{\text{O}}{\underset{ }{\text{C}}}-\text{R}_3$	Diphosphatidylglycérol (cardiolipide)	PGP	membrane interne de la mitochondrie	BENSON et STRICKLAND (1960) COULON-MORELEC et DOUCE (1968)
	Phosphatidylinositol	PI	membrane plasmique	LEPAGE et coll. (1960)

La répartition des différentes catégories de phospholipides varie suivant les particules subcellulaires (tableau 24) mais quelques lois générales peuvent être formulées (MAZLIAK, 1971).

- 1) les lécithines sont les phospholipides majeurs des membranes cytoplasmiques non chloroplastiques des cellules végétales ;
- 2) dans la plupart des membranes non chloroplastiques, la phosphatidyl éthanolamine est un deuxième phospholipide très important, en particulier dans les membranes bactériennes ;
- 3) l'ensemble des phospholipides azotés représente plus de 70 % des phospholipides totaux ; la phosphatidylsérine et l'acide phosphatidique sont souvent présents à l'état de traces, leur présence est sans doute liée à des activités enzymatiques ou/et au fait qu'ils interviennent comme intermédiaires métaboliques ;
- 4) le phosphatidylglycérol (PG) et le diphosphatidylglycérol (PGP) se concentrent dans les membranes où s'effectuent des conversions énergétiques avec transfert d'électrons : on trouve le PG dans le chloroplaste et la localisation quasi spécifique du PGP se situe dans la membrane interne de la mitochondrie. Il existe une différence entre la composition de la membrane externe de la mitochondrie, proche de celle des membranes microsomales et celle de la membrane interne, pauvre en PG et riche en PGP ;
- 5) la composition en acides gras est très variable selon les espèces. Cette variabilité n'existe pas pour une même cellule : il existe, pour une cellule donnée, un équipement enzymatique tel qu'une certaine collection d'acides gras peut être synthétisée. Cependant, les membranes péricytoplasmiques sont plus riches en acides gras saturés que les membranes intracytoplasmiques : la prépondérance d'acides gras saturés contribue à stabiliser les molécules de phospholipides dans la bicouche lipidique et augmente l'imperméabilité du plasmalemme.

Remarque : Le plasmalemme contient une assez forte proportion de cholestérol ; le rapport molaire cholestérol/phospholipides totaux est voisin de 1/1. Ce taux élevé de cholestérol a une influence positive sur la stabilisation des membranes. Différentes théories ont été proposées à propos des propriétés du complexe phospholipides - cholestérol.

b) Fonction des phospholipides membranaires.

Deux types de fonctions peuvent être distingués : les phospholipides interviennent dans les systèmes de transfert d'électrons des chaînes respiratoires ainsi que dans les phénomènes de perméabilité membranaire.

1-relations avec les chaînes de transport d'électrons : Les systèmes enzymatiques de la chaîne respiratoire dépendent de la présence des phospholipides membranaires ; cette dépendance est souvent citée comme l'exemple typique d'interaction entre protéines et lipides.

TABLEAU 24 : DISTRIBUTION DES PHOSPHOLIPIDES DANS QUELQUES
TISSUS VÉGÉTAUX (EXPRIMÉS EN MICROMOLES PAR
GRAMME DE POIDS FRAIS).

Tissu	Teneur en PL (μ moles/g de poids frais)	PC	PE	PG	PI	DPG	PS	AP	Divers	
FEUILLES										
Maïs (<i>Zea mais</i>)	1,7	26	14	28	7	14	-	-	lyso PC	} 1
Tomate (<i>Solanum lycopersicum</i>)	2,2	51	21	20	5	5	-	-		
Betterave (<i>Beta vulgaris</i>)	4,7	36	12	17	7	4	2	4	5	
COTYLEDON										
Pois (<i>Pisum sativum</i>) 11 jours	1,9	62	16	-	11	2	1	3	phosphatidyl- méthanol	2
RACINE										
Betterave (<i>Beta vulgaris</i>)	3,5**	35	17	6	5	2	12	12	4	3
TUBERCULE										
Pomme de terre (<i>Solanum tuberosum</i>)	0,7	55	28	2	12	1	1	1		4
FRUIT										
Pomme (<i>Pyrus malus</i>) var. Cox's Orange Pippin	0,5	46	31	7	13	2	1	1		5
POLLEN										
Pin (<i>Pinus ponderosa</i>)	-	60	18	6	13	2	1	-		6
SEMENCES										
Ricin (<i>Ricinus communis</i>)	1,5	13	83	7	tr				4	7
Soja (<i>Glycine max</i>)	1,2	45	15	-	25	4	1	8	Phytoglycolipides	8
PARTICULES SUBCELLULAIRES										
CHLOROPLASTES										
Maïs (<i>Zea mais</i>)	-	22	tr	65	10	tr				9
Epinaud (<i>Spinacea oleracea</i>)	5,3	47	17	26	9	tr				10
MITOCHONDRIES										
Tubercules de pomme de terre (<i>Solanum tuberosum</i>)	-	43	30	3	7	8	3	5		11
Pomme (<i>Pyrus malus</i>)	-	45	35	7	5	tr	3	5		12
Chou fleur (<i>Brassica oleracea</i>)	-	43	32	3	11	7	1	1,9		12
FRACTION MICROSOMIALE										
Pomme de terre (<i>Solanum tuberosum</i>)	-	45	33	1	16	1	1	3		11

** micromoles/g de poids sec
*** en pourcentage.

LEGENDE : PC : phosphatidylcholine - PE : phosphatidyléthanolamine -
PG : phosphatidylglycérol - PI : phosphatidylinisitol -
DPG : diphosphatidylglycérol (cardiolipide) - PS : phosphatidylsérine -
AP : acide phosphatidique.

- 1 : ROUGHAN et BATT, 1969. - Phytochem., 8, 363.
- 2 : QUARLES et DAWSON, 1969. - Biochem. J., 112, 787.
- 3 : BEISS, 1969. - Landwirtsch. Forsch., 2311, 198.
- 4 : GALLIARD, 1968. - Phytochem., 7, 1907.
- 5 : GALLIARD, 1968. - Phytochem., 7, 1915.
- 6 : Mc ILWAIN et BALLOU, 1966. - Biochemistry, 5, 4054.
- 7 : PAULOSE, VENKOB RAO et ACHAYA, 1966. - Indian J. Chem., 4, 529.
- 8 : WAGNER et WOLFF, 1964. - Fette, Seifen, Anstrichmittel, 66, 425.
- 9 : DOUCE, GUILLOT-SALOMON, LANCE et SIGNOL, 1968. - Bull. Soc.Fr.Phys.V., 14, 351
- 10 : WINTERMANS, 1960. - Biochem. Biophys. Acta, 44, 49.
- 11 : BEN ABDELKADER et MAZLIAK, 1970. - Eur. J. Biochem., 15, 250.
- 12 : MAZLIAK et BEN ABDELKADER, 1970. - Rev. Gen. Bot., 77, 53.

BUS
LILLE

En particulier, l'activité succinoxydasique ainsi que des parties du système multienzyme, telles que la CoQ-réductase, la CoQH₂-cytochrome c réductase et la cytochrome oxydase, sont presque totalement inactivées dans les mitochondries chez lesquelles les phospholipides ont été éliminés. Il se forme des complexes entre les phospholipides des membranes internes mitochondriales et le cytochrome c avec le DPG et le PI notamment) (JOLLIOT et MAZLIAK, 1973 : travaux sur les mitochondries de chou fleur).

Dans la réaction de l'oxydase du cytochrome, le substrat et l'enzyme doivent exister sous forme de complexes lipoprotéiques.

Dans les chaînes de transport d'électrons, les phospholipides mitochondriaux interviennent à 3 niveaux différents :

- ils jouent un rôle spécifique dans la formation d'une forme micellaire du cytochrome c qui permet une interaction de type lipophile avec l'enzyme ;

- ils ont une action non spécifique dans le maintien d'un état dispersé de l'oxydase tels que les atomes de Cuivre et les groupement SH qui détiennent l'activité catalytique aient une orientation convenable ;

- une ou deux molécules de DPG sont indispensables et doivent nécessairement être liées à la cytochrome oxydase.

De la même façon, les phospholipides sont nécessaires dans les systèmes de transport d'électrons dans le réticulum endoplasmique (JONES et WAKIL, 1967) (activité NADH cytochrome c oxydo-réductase) ; de plus, les phospholipides sont indispensables, dans les microsomes de foie, pour les processus d'oxydation du NADPH couplés soit à la désaturation du stéaroylcoenzyme A soit à l'hydroxylation et aux réactions de déméthylation (STROBEL et coll., 1970), enfin, DUTTERA et coll. (1968) ont démontré la nécessité des phospholipides dans l'activité glucose 6 phosphatase dans les microsomes de cellules hépatiques.

2-rôle dans les réactions de transport membranaire : Il existe une littérature abondante sur le rôle des phospholipides dans les réactions de transports membranaires. Les propriétés de perméabilité de plusieurs systèmes membranaires ont été mises en relation avec leur composition en phospholipides. Des membranes artificielles composées uniquement de deux couches bimoléculaires de phospholipides permettent d'imiter les phénomènes de perméabilité passive des membranes biologiques. Ainsi, des découpleurs de phosphorylation oxydative induisent une augmentation notable de la conductance en protons des couches phospholipidiques, ce qui est en accord avec l'hypothèse de MITCHELL ; selon cette théorie ces découpleurs agissent comme transporteurs de protons liposolubles à travers la membrane mitochondriale interne pour éviter la formation de gradients de protons au cours du transport d'électrons.

La valinomycine et d'autres ionophores produisent un transport sélectif de K^+ et d'autres cations au travers des membranes phospholipidiques artificielles de façon analogue à leurs effets sur les mouvements des cations au travers des membranes mitochondriales ou d'autres types de membranes biologiques.

Chez de nombreuses espèces de mammifères, la perméabilité des membranes érythrocytaires aux substances ioniques et non ioniques suivent une relation étroite avec le rapport lécithine/sphingomyéline. Comme les lécithines contiennent généralement une proportion plus élevée d'acides gras insaturés que les sphingomyélines, l'hypothèse a été émise que la perméabilité peut dépendre partiellement du degré de saturation des phospholipides membranaires.

Les observations de DE GIER et coll. (1968) sur des membranes artificielles, préparées à partir de phospholipides purs, sont en accord avec cette interprétation. La vitesse de pénétration des vésicules liposomiaux par les non électrolytes ou les cations augmente avec le degré d'insaturation des acides gras phospholipidiques.

Des travaux récents ont été consacrés aux effets régulateurs des phospholipides sur l'ATPase mitochondriale impliquée dans la phosphorylation oxydative. Les phospholipides jouent aussi un rôle important dans la fonction d'autres ATPases subcellulaires impliquées dans les réactions de transport membranaire. L'ATPase plasmique qui est activée par les ions Na^+ et K^+ , et qui participe sans aucun doute à la translocation de ces cations, dépend des phospholipides dans quelques tissus ; une autre ATPase, qui intervient dans le transport actif, est celle du réticulum sarcoplasmique, impliquée avec l'échange des ions Ca^{++} , dont la sortie est également concomitante avec l'hydrolyse d'ATP dans les vésicules microsomales isolées du muscle. Le traitement de microsomes par la phospholipase C inactive à la fois l'ATPase et le transport de Ca^{++} ; l'activité est restaurée par adjonction de phospholipides (lécithine, lysolécithine ou acide phosphatidique).

3-influence des lipides sur les activités enzymatiques liées aux membranes :

Les techniques de biophysique ont récemment permis de mettre en évidence l'état dynamique dans lequel se trouvent les phospholipides. Ainsi, les longues chaînes aliphatiques des acides gras constitutifs sont capables de se plier rapidement ; d'autre part, des molécules peuvent se déplacer à l'intérieur des membranes (DEVAUX et Mac CONNELL, 1973) ; enfin, des phospholipides passent très lentement d'un feuillet à l'autre (mouvement flip-flop) (VERKLEIJ et coll., 1973).

La structure et l'activité des protéines membranaires dépendent, en partie au moins, de cet environnement lipidique ; WARREN et coll. (1975) ont montré que

l'ATPase du sarcoplasme musculaire doit, pour rester active dans le transport du calcium, être entourée d'un anneau de 30 molécules de phospholipides.

Les lipides membranaires peuvent donc être divisés en 2 classes : les lipides liés entourant les protéines et les lipides mobiles qui diffusent latéralement à l'intérieur de la membrane. Le passage des lipides d'un état liquide à un état de gel par exemple, induit l'inhibition de la respiration mitochondriale lorsque la température s'abaisse au-dessous de 10°C chez les végétaux sensibles au froid.

c) Les phospholipides végétaux.

Il faut distinguer les tissus chlorophylliens des autres tissus. Le tableau 24 indique la composition et la concentration en phospholipides de quelques plantes.

Les lipides totaux peuvent constituer jusqu'à 10 % du poids sec des feuilles et jusqu'à 40 % du poids sec de chloroplastes isolés. Les phospholipides constituent 14 % des lipides des lamelles chloroplastiques, les galactolipides 40 %, les sulfolipides 7 %, les chlorophylles, caroténoïdes et quinones 37 % des lipides totaux. Le phosphatidylglycérol est le phospholipide principal des chloroplastes ; la phosphatidylcholine et le phosphatidylinositol sont présents seulement en faible quantité (3 % et 2 % respectivement des lipides totaux) (ALLEN et coll., 1966) ; on trouve essentiellement dans les lamelles chloroplastiques le monogalactosyldiglycéride (MGDG), le digalactosyldiglycéride (DGDG) et le sulfoquinovosyldiglycéride (SQDG). Ces lipides ne sont pas répartis de façon uniforme dans les membranes chloroplastiques : le MGDG est concentré dans les membranes internes du thylacoïde tandis que le DGDG est surtout localisé dans les enveloppes chloroplastiques.

Dans les feuilles étiolées et dans les tissus non photosynthétiques des plantes supérieures, la phosphatidylcholine et la phosphatidyléthanolamine sont, normalement, les phospholipides les plus abondants. Toutes les algues vertes étudiées contiennent les mêmes phospholipides que les plantes supérieures bien que les proportions relatives des différentes catégories varient avec l'espèce et avec les conditions culturales. La composition en phospholipides varie également avec la température chez les algues.

Les bactéries photosynthétiques contiennent également le phosphatidylglycérol comme les chloroplastes ; la phosphatidyléthanolamine est relativement abondante chez ces microorganismes.

Excepté pour les chloroplastes, il existe peu d'informations sur la composition en lipides de préparations subcellulaires de cellules végétales ; les mitochondries sont riches en phosphatidylcholine et en phosphatidyléthanolamine. Le phosphatidylinositol et le diphosphatidylglycérol sont aussi présents avec une plus forte concentration en diphosphatidylglycérol dans les mitochondries que dans le tissu entier.

Bien que la phosphatidylcholine, la phosphatidyléthanolamine et le phosphatidylglycérol soient en général les phospholipides les plus importants des végétaux supérieurs, tous les tissus étudiés contiennent de petites quantités de phosphatidylinositol et de diphosphatidylglycérol ; la phosphatidylsérine se trouve, quand elle existe, en petites quantités. L'acide phosphatidique existe en faibles quantités et sa présence en teneur significative dans les extraits végétaux, est certainement due à l'activité de la phospholipase D au cours de l'extraction.

La N-acétylphosphatidyléthanolamine a été identifiée dans des semences (Pois et Soja) ainsi que dans la farine de Blé (QUARLES et coll., 1968 ; ANEJA et coll., 1969).

Quelques végétaux contiennent également un phytoglycolipide complexe contenant du phosphore dont la structure a été élucidée par CARTER et coll. (1969).

1-distribution des acides gras dans les phospholipides végétaux : Ils sont répertoriés dans le tableau 25. La composition en acides gras des lipides végétaux dépend des conditions de l'environnement en général. La lumière et la température en sont des éléments.

Alors qu'un grand nombre d'acides gras ont été identifiés dans les plantes, on rencontre chez les phospholipides, des acides gras majeurs : les acides palmitique, linoléique et linolénique et, en quantité moins importante, les acides stéarique et oléique. Ceux dont les longueurs de chaîne sont autres que C₁₆ ou C₁₈ n'existent qu'à l'état de traces.

L'acide hexadécénoïque isomère 9 ou 7 se retrouve en faibles quantités. L'isomère 3-trans-hexadécénoïque qui intervient spécifiquement en position 2 du phosphatidylglycérol dans les tissus photosynthétiquement actifs des végétaux supérieurs peut représenter 70 % des acides gras totaux en position 2 de ce lipide pour les chloroplastes d'épinard.

Les acides gras oxygénés, branchés ou à nombre impair d'atomes de carbones se retrouvent souvent parmi les triglycérides des semences ainsi que dans les

TABLEAU 25 : RÉPARTITION DES ACIDES GRAS DANS LES PHOSPHOLIPIDES VÉGÉTAUX (EXPRIMÉS EN POURCENTAGES RELATIFS).

Tissu		C14:0	C16:0	C16:1	C18:0	C18:1	C18:2	C18:3	Divers
FEUILLES									
Ricin (<i>Ricinus communis</i>)	PC		38		3	3	24	33	
	PE		36		2	1	21	40	
	PG	1	47	19	4	12	4	20	
	PI		54	4	5	8	6	34	
RACINES									
Navet (<i>Brassica campestris</i>)	PC		10	1	1	11	20	58	
	PE		13	1	1	11	25	50	
	PI		34	1	1	4	15	47	
	CL		11	1	1	9	21	57	
	lipides totaux		13	1	1	9	19	57	
TUBERCULES									
Pomme de terre (<i>Solanum tuberosum</i>)	PC		17		3	5	67	8	
	PE		19		3	6	64	8	
	PG		48		5	6	38	4	
	PI		43		3	2	43	8	
	CL		10		7	10	58	16	
	lipides totaux		20		3	4	60	15	
FRUITS									
Pomme (<i>Pyrus malus</i>)	PC	3	23	1	1	10	61	3	12 : 0 (3)
	PE	1	25	-	2	7	65	1	12 : 0 (1)
	PG	1	44	9	3	15	22	-	12 : 0 (2)
	PI	1	40	3	3	7	37	2	12 : 0 (1) 16 : 2 (0,6) 16 : 3 (0,4)
	CL	2	34	10	3	11	32	0	12 : 0 (2) 16 : 2 (1) 16 : 3 (1)
POLLEN									
Pin (<i>Pinus ponderosa</i>)	PC		18		2	17	52	4	20:2(4) autres(6)
	PE		21		0	8	50	8	20:2(4) autres(8)
	PG		38		2	10	38	3	- autres(9)
	PI		40		0	17	39	0	- autres(4)
	CL		22		5	14	29	2	20:2(5) autres(22)
	PS		41		4	22	18	0	20:2(8) autres(8)

LEGENDE : PC : phosphatidylcholine - PE : phosphatidyléthanolamine - PG : phosphatidylglycérol - PI : phosphatidylinositol - CL : cardiolipide (diphosphatidylglycérol) - PS : phosphatidylsérine.

1 : NICHOLS et JAMES, 1964. - Fette, Seifen, Anstrichmittel 66, 1003.

2 : LEPAGE, 1967. - Lipids, 2, 44.

3 : GALLIARD, 1968. - Phytochem., 7, 1907.

4 : GALLIARD, 1968. - Phytochem., 7, 1915.

5 : Mc ILWAIN et BALLOU, 1966. - Biochemistry, 5, 4054.



cires épidermiques des tissus végétaux et n'appartiennent normalement pas aux phospholipides.

La composition en AG des phosphatidylcholines et des phosphatidyléthanolamines sont similaires. Le phosphatidylinositol et le diphosphatidylglycérol contiennent normalement une plus forte proportion d'acides gras saturés (essentiellement l'acide palmitique) que la phosphatidylcholine et la phosphatidyléthanolamine.

La distribution des acides gras entre les positions 1 et 2 des phospholipides est analogue à celle des lipides animaux : les acides gras saturés sont localisés principalement en position 1 tandis que la position 2 est occupée surtout par les insaturés. Cependant, les acides linoléique et linoléique constituent normalement 60 à 80 % des acides gras des phospholipides végétaux et la distribution de ces acides gras polyinsaturés entre les 2 positions est identique. Une quantité significative d'acide linoléique peut se trouver en position 1.

2-précautions particulières à prendre pour l'extraction des lipides végétaux :
Beaucoup de végétaux contiennent des enzymes lipolytiques très actifs, libérés au cours du broyage cellulaire, telles la phospholipase D et les acylhydrolases. De tels enzymes détruits même à faible température, voient leurs effets accentués par l'utilisation de solvants organiques, au cours de l'extraction. Il faut donc pour atténuer l'hydrolyse enzymatique, "blanchir" les tissus, en les homogénéisant avec l'isopropanol (de préférence à chaud) avant l'extraction par les solvants appropriés.

Le contenu vacuolaire contient de fortes concentrations en acides organiques ; leur libération, au cours de l'extraction, produit des mélanges acides et entraîne une baisse du pH.

Des composés phénoliques sont également abondants dans les cellules végétales et leur oxydation (spontanée ou enzymatique), au cours de l'extraction, conduit souvent à des substances polyphénoliques, très colorées, qui inactivent de nombreuses enzymes par un processus de "tannage".

Les enzymes lipolytiques mentionnés ci-dessus peuvent attaquer les structures membranaires lipoprotéiques, ce qui provoque, par exemple, l'inactivation des chloroplastes et des mitochondries.

Un contrôle du pH, la prévention et l'élimination des composés polyphénoliques et des acides gras sont indispensables pour une production satisfaisante d'extraits actifs et d'organites subcellulaires fonctionnels.

d) Résultats expérimentaux (CARON et BRIS, 1974).

1-analyse des esters méthyliques d'acides gras naturels : L'extraction des esters méthyliques d'acides gras naturels est effectuée sur le matériel frais, non congelé.

Cette extraction (fiches techniques n° 9 et 10) a nécessité la recherche d'une méthode spécifique, différente de celle de FOLCH (1957), afin d'éviter la méthylation ; les lipides sont extraits par le mélange chloroforme-isopropanol (2/1, v/v) (FATHIPOUR et coll., 1967). Le résidu sec est repris par un volume minimum d'éther de pétrole 60-70°. L'analyse qualitative des esters méthyliques naturels est effectuée après purification sur colonne d'acide silicique (fiche technique n° 11), évaporation à sec, redissolution dans l'hexane et analyse par chromatographie en phase gazeuse sur colonne de DEGS.

L'analyse chromatographique permet de caractériser l'oléate et l'arachidonate de méthyle dans les pollens des plantes S₁, Bb et Bg ; aucun ester méthylique naturel n'a pu être mis en évidence dans les extraits de style vierge.

La comparaison des chromatogrammes des extraits de pollen met en évidence la grande homogénéité qualitative et quantitative des extraits en oléate et arachidonate de méthyle.

Le pollen d'*Oenothera missouriensis* a une composition en esters méthyliques naturels différente de celle du Blé, dans lequel CONNELL (1964) a caractérisé le caproate et le caprylate de méthyle. Par contre, elle semble se rapprocher du pollen de Maïs au niveau duquel FATHIPOUR et coll. (1967) ont mis en évidence l'oléate et l'arachidonate de méthyle quoiqu'en quantité plus faible que le linoléate et le palmitate.

Une telle composition se révèle homogène dans chacun des pollens issus des 3 géotypes étudiés (CARON, 1972).

2-analyse des acides gras entrant dans la composition des lipides totaux : Les tissus végétaux sont riches en enzymes, en particulier en phospholipases, qu'il est indispensable d'inactiver avant toute extraction. De plus, les grains de pollen sont entourés d'une enveloppe dure et difficile à rompre : l'exine. Pour ces deux raisons, le broyage et l'homogénéisation des tissus sont effectués dans l'azote liquide, qui favorise l'éclatement de l'exine et qui inactive les phospholipases et les galactolipases présentes.

Les lipides sont ensuite extraits par le mélange de FOLCH. A l'issue des divers procédés d'extraction, un dosage du phosphore lipidique est réalisé sur les résidus d'extraction pour contrôler l'absence de phospholipides. Les résultats de ces dosages montrent que les teneurs en phosphore sont toujours inférieures à 1 % pour le pollen et nulles pour le style.

L'analyse des acides gras des extraits lipidiques totaux est effectuée après saponification et méthylation des acides gras libérés, par chromatographie en phase gazeuse sur colonne de DEGS. Après étalonnage avec des mélanges témoins d'ester méthyliques d'acides gras, les divers constituants sont évalués en pourcentage molaire (fiche technique n° 12). Les résultats sont rassemblés dans le tableau 26 (COUSTAUT et LINDER, 1977).

L'acide palmitique et l'acide linoléique peuvent être considérés comme les acides majeurs du pollen tandis que les acides myristique et tridécanoïque sont présents à l'état de traces. Enfin, on retrouve dans tous les pollens étudiés 2 acides gras indéterminés, dénommés X_1 et X_2 .

Comparés entre eux, la composition en acides gras des pollens présente quelques différences : le pollen issu de la plante S_2S_4 montre une forte teneur en acide linoléique (12 %) tandis que les pollens issus de S_1S_1 et S_1S_2 ont des teneurs en cet acide 6 fois plus faibles. Le pollen S_2S_4 ne contient pas d'acide caprique alors que S_1S_1 et S_1S_2 en sont pourvus respectivement de 9 % et 4 %. Le taux d'acide caprique semble donc en relation avec la présence de l'allèle S_1 ; il faudrait confirmer ce fait expérimental avec du pollen provenant d'autres plantes possédant l'allèle S_1 lié à un autre allèle S (plante S_1S_3) par exemple).

Les acides gras des lipides du style vierge, autopolinisé et xéнопollinisé sont identiques à ceux mis en évidence dans les extraits de pollen à l'exception des acides gras inconnus X_1 et X_2 . Le tableau montre l'homogénéité de la distribution des acides gras dans les styles : parmi eux, les acides palmitique, linoléique et linoléique se retrouvent en quantités relativement importantes.

Il convient de noter que l'introduction des acides gras du pollen sur les pistils pollinisés ne modifie que très légèrement la teneur en acides gras du style vierge ; en particulier, l'acide caprique, trouvé en abondance dans le pollen S_1 , n'apparaît pas dans les styles S_1S_1 autopolinisés.

TABLEAU 26 : ACIDES GRAS DES LIPIDES TOTAUX DU POLLEN ET DU STYLE
(COUSTAUT ET LINDER, 1977).



Acides gras des Lipides totaux (% molaire)	POLLEN				STYLES		
	S ₁ S ₁	S ₁ S ₂	S ₂ S ₄	Vierges	Autopollinisés	Xénopollinisés	
-Acide caprique (C10 : 0)	9	4	0	0	0	0	
-Acide laurique (C12 : 0)	5	3	traces	2,4	2	2,1	
-Acide tridécanoïque (C13 : 0)	1,2	1,8	traces	traces	traces	traces	
-Acide myristique (C14 : 0)	1,5	1,3	traces	traces	traces	traces	
X ₁	+	+	+	0	0	0	
-Acide palmitique (C16 : 0)	40	48	43	32	28	29	
-Acide stéarique (C18 : 0)	2,5	2	1,3	1,4	1	1,1	
-Acide linoléique (C18 : 2)	2,2	2,3	12	43	39	37	
-Acide linoléique (C18 : 3)	38,6	37,6	43,7	21,2	30	30,8	
X ₂ (ac. vernolique) (?)	+	+	+	0	0	0	

En conclusion, deux esters méthyliques ont été identifiés dans le pollen : l'oléate et l'arachidonate de méthyle ; l'homogénéité de leurs distributions qualitative et quantitative dans les 3 géotypes de pollens et leur absence totale du style vierge sont des éléments contradictoires avec l'hypothèse d'un rôle de facteur de croissance spécifique de ces acides gras.

La comparaison des résultats concernant le pollen et le style vierge met en évidence que les teneurs relatives en acides gras du pollen et du style vierge sont équivalentes, exception faite de l'acide linoléique ; le style vierge est très riche en acide linoléique mais ne contient pas d'acide caprique. La pollinisation (compatible ou non) ne modifie que très légèrement la teneur en acides gras.

3-extraction, séparation et identification des phospholipides : L'extraction est réalisée selon la méthode de FOLCH et coll. (1975) (fiche technique n° 12) ; les dosages de phosphore lipidique sont effectués par la méthode de BRIGGS (1924) (fiche technique n° 13). Les résultats correspondent au pourcentage de phosphore exprimé par rapport au poids de matériel végétal frais (tableau 27) (CARON et BRIS, 1972).

La lecture du tableau met en évidence une teneur en phosphore lipidique beaucoup plus élevée dans le pollen que dans le style vierge. De plus, les styles vierges entre eux ainsi que les styles pollinisés présentent des taux de phosphore constants. Seule la comparaison style vierge/style pollinisé permet de déceler dans le style non pollinisé, deux fois plus de phosphore lipidique que dans le cas de la pollinisation ; la très faible différence observée entre styles autopollinisés et xéнопollinisés ne peut être considérée comme significative, à ce stade de l'analyse.

La comparaison la plus intéressante reste donc celle des pollens entre eux. Il faut noter que dans le pollen issu de la plante Bg, le taux de phosphore lipidique est nettement supérieur à celui du pollen issu des plantes S₁ et Bb (1,47 % contre 1,07 et 1,05 %). Il conviendra de vérifier que ce résultat dépend de l'absence de l'allèle S₁ dans le pollen, d'autant plus que la teneur en phosphore lipidique est également plus élevée dans les styles vierges S₂S₄.

Tableau 27 : Teneurs en phosphore lipidique du pollen et du style d'*Oenothera missouriensis*.

Matériel	Génotype de la plante	Pourcentage de P/PF
Pollen	S_1S_1	1,07
	S_1S_2	1,05
	S_2S_4	1,45
Style	<u>vierges</u>	
	S_1S_1	0,42
	S_1S_2	0,45
	S_2S_4	0,47
	<u>autopol.</u>	
	$S_1S_1 \times S_1S_1$	0,15
	$S_1S_2 \times S_1S_2$	0,16
	$S_2S_4 \times S_2S_4$	0,14
	<u>xénopol.</u>	
	$S_1S_1 \times S_2S_4$	0,21
$S_2S_4 \times S_1S_1$	0,19	

.fractionnement des phospholipides : c'est la chromatographie d'adsorption sur colonne d'acide silicique Mallinckrodt 100 mesh qui permet de séparer les diverses catégories de lipides polaires dans un ordre de polarité croissante : les lipides neutres sont élués les premiers et les phospholipides les plus polaires les derniers (fiche technique n° 15). A l'issue du fractionnement, on recueille 4 fractions : la première, chloroformique, contient les lipides neutres ; la seconde, acétonique (fraction A) contient les glycolipides ; les 3ème et 4ème fractions (B et C) renferment la totalité des phospholipides. Les dosages de phosphore lipidique montrent que la séparation n'est pas tout à fait conforme aux résultats attendus ; en particulier, on retrouve une quantité non négligeable de phosphore lipidique dans la fraction A ; la purification de cette fraction nécessite une nouvelle étape de fractionnement réalisée cette fois sur colonne de DEAE cellulose avec comme éluants le chloroforme, le chloroforme méthanol (95 : 5, v/v), le chloroforme méthanol (90 : 10, v/v) et le chloroforme méthanol (2 : 1, v/v) saturé avec NH_4OH concentré (fiche technique n° 16).

Les 3 premières fractions contiennent les glycolipides ; la fraction 4 renferme la quasi totalité du phosphore lipidique de la solution initiale ; en moyenne 95 % du phosphore se retrouvent dans cette fraction chez le pollen et 98 à 99 % chez le style.

4-analyse qualitative des phospholipides : Elle est basée sur la chromatographie en couche mince (fiche technique n° 17) ; l'identification est réalisée par des témoins purs et des réactifs spécifiques dans les conditions suivantes :

- couche mince de gel de silice Merck G de 250 μ d'épaisseur ;
- solvant : chloroforme - méthanol - acide acétique - eau (170/25/25/6, v/v) ;
- migration de 12 cm ;
- révélation au réactif de Zinzdaze ou plus spécifique par les réactifs de Dragendorff, de Scherer, à 1^a ninhydrine.

.étude des fractions 4 et B : par chromatographie sur couche mince, un spot unique de Rf : 0,65 dans le cas du pollen, et deux spots dans celui du style (Rf : 0,65 et 0,45) sont identifiés.

Le spot de Rf : 0,65 correspond à l'acide phosphatidique, comme le confirme l'analyse sur couche mince dans le solvant alcalin : chloroforme-méthanol-ammoniaque 7 N (65/30/4, v/v) (dans ces conditions, l'acide phosphatidique ne migre pas alors que tous les autres phospholipides migrent).

Dans ce solvant alcalin, les fractions provenant du pollen présentent également un seul spot de Rf nul tandis que celles issues des styles révèlent 2 taches de Rf 0 et 0,42.

Le spot de Rf 0,45 identifié dans le système de solvant acide est très intense pour toutes les fractions 4 des styles mais n'apparaît que pour les seules fractions B issues des styles vierges. Sa révélation positive au réactif de Zinzdaze l'identifie soit au phosphatidylglycérol soit au di-phosphatidylglycérol. Il s'agit en fait de phosphatidylglycérol : la preuve est apportée par chromatographie sur gel de silice H avec migration dans deux solvants de polarité différente d'une part, et par l'analyse du rapport phosphore/glycérol d'autre part ; l'étude de ce rapport fournit des valeurs comprises entre 14,7 et 17,2 (valeur théorique pour PG : 15,5 et pour PGP : 10,33).

En résumé, les fractions 4 et B sont composées d'acide phosphatidique chez le pollen et d'acide phosphatidique et de phosphatidylglycérol chez le style.

.étude des fractions C : les fractions des différents extraits polliniques sont chromatographiées dans les conditions expérimentales décrites ci-dessus.

4 spots sont révélés par le réactif de Zinzdaze ; la comparaison de leur Rf à ceux des témoins et l'utilisation de réactifs de révélation spécifique (réactif de Dragendorff et réactif à la ninhydrine) permettent l'identification directe de 3 phospholipides :

- la phosphatidyléthanolamine ;
- la phosphatidylcholine ;
- la phosphatidylsérine.

La détermination du 4ème spot est plus délicate : on obtient une tache rose-orangé avec le réactif de Scherer qui peut être le phosphatidyl-inositol (fiche technique n° 17). La confirmation de la nature de cette tache provient de son analyse en chromatographie gazeuse, après hydrolyse du phospholipide : le phosphatidylinositol est hydrolysé et l'inositol libéré est triméthylsilylé et chromatographié sur colonne de OV 17 à 3 % chromosorb W 60-80 mesh à 220°C.

L'analyse établit qu'il s'agit effectivement de cet ose et que le pollen de la plante Bg diffère par sa teneur en inositol des 2 autres pollens : il est beaucoup moins riche que les pollens issus des plantes S₁ et Bb.

Dans le style, on obtient également les 3 phospholipides précédents (phosphatidyléthanolamine, phosphatidylcholine, phosphatidylsérine) mais le phosphatidylinositol identifié dans le pollen est absent du style.

5-analyse des acides gras constitutifs des phospholipides (LINDER et COUSTAUT, 1973) : Elle s'effectue après saponification des phospholipides et méthylation des acides gras par chromatographie en phase gazeuse sur colonne de DEGS à 176°C (fiche technique n° 18).

Les acides gras des phospholipides du pollen sont les suivants :

- l'acide hexadécanoïque (palmitique) ;
- l'acide cis 9-cis 12-cis 15 octadécatriénoïque (l'acide linoléique).

Dans les styles, par contre, 3 acides gras entrent dans la composition des phospholipides :

- l'acide hexadécanoïque (palmitique) ;
- l'acide cis 9-cis octadécadiénoïque (linoléique) ;
- l'acide cis 9-cis 12-cis 15 octadécatriénoïque (linoléique).

Les résultats moyens exprimés en pourcentage molaire après planimétrie des chromatogrammes sont réunis dans le tableau suivant :

	Acide palmitique	Acide linoléique	Acide linoléique
Pollen	87	0	13
Style	41	21	38

En résumé, l'étude analytique des phospholipides du pollen et du style d'*Oenothera missouriensis* met en évidence :

- des différences quantitatives entre les pollens de 3 plantes S₁, Bb et Bg : le pollen Bg bien que plus riche en phospholipides totaux possède des teneurs en acide phosphatidique et en phosphatidylinositol plus faibles que S₁ et Bb ; les taux de phosphatidylcholine, phosphatidylsérine et phosphatidyléthanolamine y sont au contraire augmentés ;

- il existe des différences quantitatives entre le taux de phospholipides des styles vierges et autopollinisés : le style vierge est deux fois plus riche en phospholipides que le style pollinisé ;

- il existe des différences qualitatives entre les phospholipides du style et ceux du pollen : le phosphatidylinositol n'existe que dans le pollen et le phosphatidylglycérol que dans le style ; au niveau des acides gras constitutifs, l'acide linoléique n'appartient qu'au style.

6-conclusion : En conclusion de cette étude sur les esters méthyliques d'acides gras et les phospholipides du pollen et du style d'*Oenothera missouriensis*, nous pouvons dire que les tentatives d'isolement et de caractérisation de ces constituants cellulaires conduisent à des résultats positifs. Cependant, les différences qualitatives et quantitatives constatées entre les différents génotypes, entre le pollen et le style ou entre les styles ayant subi la pollinisation compatible ou non doivent être envisagées avec beaucoup de prudence, dans le cadre de leur rôle éventuel dans les processus d'autoincompatibilité ou de leurs relations avec les différents allèles S.

Le tableau récapitulatif (tableau 28) suivant permet de résumer et de situer les variations observées.

Les faits les plus saillants sont la présence d'esters méthyliques, d'acides gras naturels (oléate et arachidonate de méthyle) retrouvés exclusivement dans le pollen quel que soit l'allèle S ; l'acide linoléique est une caractéristique du style ; enfin si le phosphatidylinositol est spécifique au pollen (avec des variations selon les génotypes), le phosphatidylglycérol n'apparaît que dans les styles.

Il faut également noter que s'il existe un métabolisme phospholipidique caractéristique du pollen ou du style, la pollinisation, compatible ou non, ne

semble pas avoir un rôle particulier dans la teneur et la répartition des lipides phosphorylés.

VI - LES GLYCOPHINGOLIPIDES

Les glycosphingolipides (GSL) sont des constituants membranaires des organismes procaryotes et eucaryotes. Peu abondants, leur importance fonctionnelle dans les membranes, a été mise en évidence par des travaux récents.

Constituants de la matrice lipidique membranaire, les GSL apparaissent, en effet, comme les éléments de spécificité cellulaire (MARTENSON, 1969). De plus, la teneur en GSL varie dans les tissus, les organes ou les organismes en fonction de l'espèce (SVENNERHOLM, 1970), du clône (COLES et coll., 1970), du sexe (GRAY, 1971), de l'âge (COLES et coll., 1970) et de l'état physiologique (BRADY, 1973). Mais c'est le rôle, supposé et aujourd'hui mieux compris, des GSL dans les mécanismes physiologiques qui conditionnent la reconnaissance des cellules entre elles et la transformation des signaux inter ou extra-cellulaires en réponses métaboliques intra-cellulaires qui nous a guidé à entreprendre l'analyse de ces constituants dans le cadre de l'étude sur l'autoincompatibilité de fécondation. En effet, dans ces mécanismes, on distingue généralement 3 phases :

- la reconnaissance et la liaison d'une substance effectrice à la surface cellulaire ;
- la transmission de l'information à travers la membrane plasmique ;
- l'activation de voies métaboliques intra-cellulaires.

Dans le règne animal, de nombreux auteurs ont montré que les GSL sont effectivement des récepteurs membranaires spécifiques capables de fixer des ions, des protéines (ou des glycoprotéines) ce qui influencera le métabolisme cellulaire.

Nous envisagerons successivement la localisation des GSL, leur structure et leur métabolisme avant de résumer les différentes fonctions dans lesquelles ils sont impliqués puis nous exposerons nos résultats expérimentaux.

a) Localisation des glycosphingolipides.

Les GSL sont des constituants membranaires. Le rapport molaire : glycosphingolipides totaux/phospholipides est de 0,045 pour la cellule entière, de 0,076 pour la membrane plasmique et de 0,023 pour le reticulum endoplasmique (CRITCHLEY et VICKER, 1977) ; dans certains cas, membranes des microvillosités intestinales, myéline, les GSL peuvent constituer jusqu'à 25 % des lipides totaux.

YOGEEESWARAN et coll. (1972) ont trouvé 3 à 5 fois plus de gangliosides dans le plasmalemma que dans la cellule entière. Plus précisément, les GSL se situent au niveau de la partie externe de la double couche de lipides membranaires (SINGER, 1974). Cette localisation est confirmée par la mise en évidence de la sensibilité des glycolipides aux dégradations enzymatiques sur des cellules intactes (galactosyloxydases et neuraminidases (GAHMBERG et HAKOMORI, 1975), leur accessibilité aux anticorps (HAKOMORI et KIJIMOTO, 1972), et par les études en immunofluorescence (BARA et coll., 1973)).

Dans l'architecture membranaire, la partie lipophile des GSL est ancrée dans la matrice phospholipidique et les résidus osidiques orientés vers l'extérieur de la membrane. Cette structure est d'ailleurs variable : GAHMBERG et HAKOMORI (1975) ont pu montrer que la partie osidique des GSL n'est plus accessible à l'hydrolyse enzymatique lorsque la cellule vieillit : les chaînons osidiques ne sont plus dégradés et semblent enfouis à l'intérieur de la membrane ; le phénomène a été également mis en évidence pour des GSL de cellules cultivées *in vitro* (HAKOMORI, 1975) : le taux des GSL augmente avec la prolifération cellulaire mais leur réactivité vis-à-vis de leur antisérum spécifique diminue. L'exposition de la partie hydrophile vers l'extérieur semble être fonction du cycle cellulaire, et serait en relation avec les variations de la teneur et de la distribution des glycoprotéines de surface ainsi qu'avec la fluidité de la membrane, ce qui doit permettre de définir une structure des GSL membranaires variable selon leurs fonctions cellulaires.

b) Structure des GSL - nomenclature.

De nombreuses revues générales (en particulier WIEGANDT, 1971 ; MORELL et BRAUN, 1972) ayant été consacrées à la structure et à la classification des GSL, nous nous contenterons de résumer les travaux de leurs auteurs.

Les GSL sont constitués d'une base à longue chaîne (BLC) combinée à un acide gras en position 2 (par une liaison amide) et à 0,1 ou plusieurs oses, par une liaison osidique le plus souvent en 1-4 (figure 29).

Les GSL présentent une grande diversité structurale résultant de la variabilité de leurs 3 composants.

Certains GSL, plus complexes, contenant en plus des substituants sulfuriques et phosphoriques ont été identifiés, en particulier chez les végétaux (CARTER et coll., 1969).

Globalement, on peut distinguer :

- une partie lipophile : BLC + AG ;
- une copule osidique hydrophile.

1-les *céramides* (CER) : Ils correspondent aux dérivés N-acylés en position 2 d'une base à longue chaîne et d'un acide gras. Il existe une grande variété d'acides gras et de bases à longue chaîne susceptibles d'entrer dans la composition des céramides (KARLSSON, 1965, 1968, 1970, 1971 ; HITCHOCK, 1975).

2-les *GSL neutres* : Parmi eux, on distingue :

- les monoglycosylcéramides ou cérébrosides sont des céramides sur lesquels est fixée une molécule d'hydrate de carbone, le plus souvent glucose ou galactose, par une liaison osidique ;
- les diglycosylcéramides dérivant des précédents par l'adjonction d'une molécule supplémentaire d'hexose ;
- les dérivés substitués par des osides plus complexes correspondent aux tri, tétra... etc. glycosylcéramides.

3-les *sulfatides ou GSL acides* : Ils correspondent aux cérébrosides dont le résidu osidique est sulfaté.

4-les *gangliosides* : Très importants chez les animaux, ce sont des GSL contenant une ou plusieurs molécules d'acide sialique (soit l'acide N-acétylneuranimique -A.N.A.N.- soit l'acide N-glycosylneuranimique -A.N.G.N.-).

5-les *sphingomyélines* : Ils présentent dans leur molécule un résidu de choline.

6-les *phytoglycosphingolipides* : Leur structure a été élucidée par CARTER et coll. (1969) et comporte une céramide (4-hydroxy-N-acylsphinganine) attaché par une liaison phosphodiester à un oligosaccharide pouvant contenir (figure 30) :

- l'inositol ;
- l'acide hexuronique ;
- des hexosamines ;
- le mannose ;

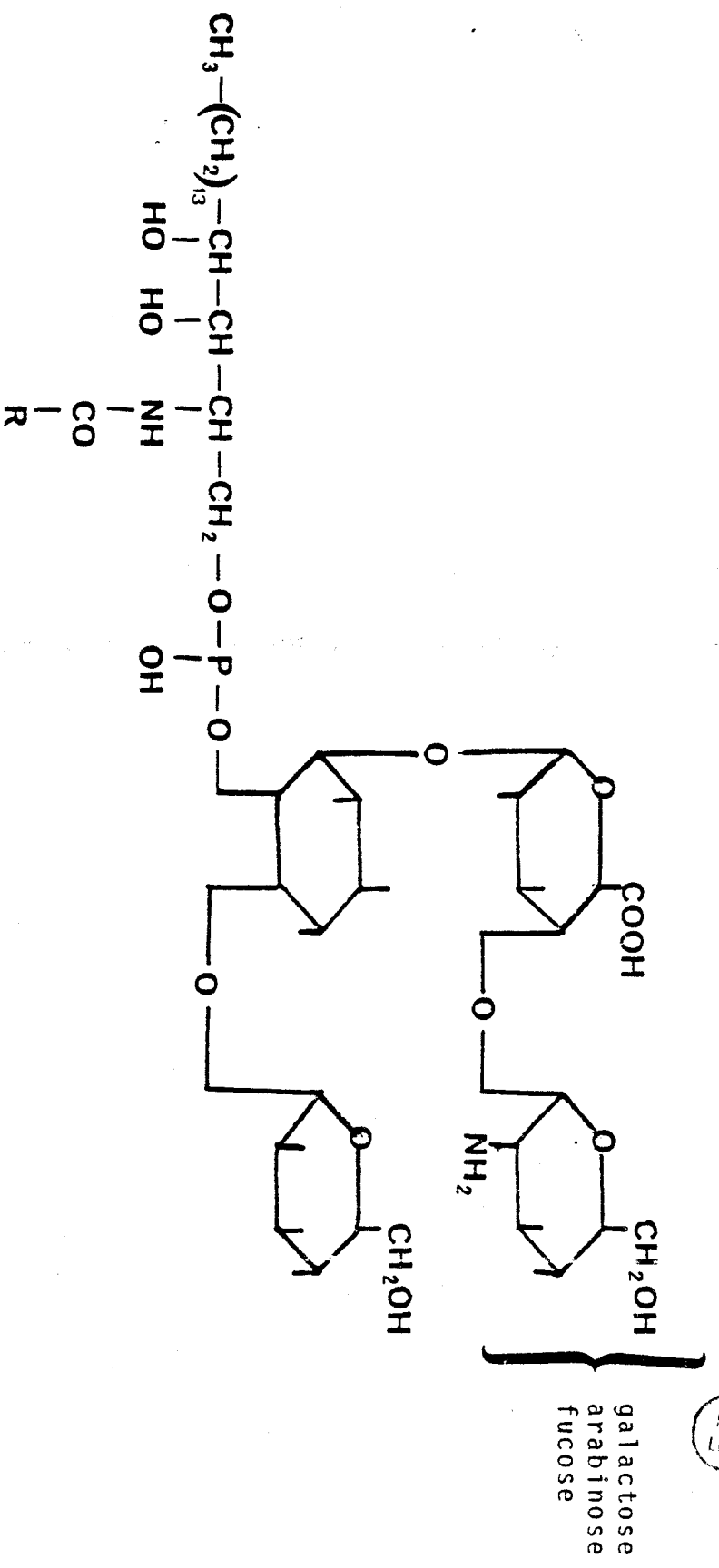


FIGURE 30 : STRUCTURE D'UN PHYTOGLYCOSPHINGOLIPIDE. D'APRÈS CARTER (1969).

- le galactose ;
- l'arabinose ;
- le fucose.

Ces composés ont été isolés dans les végétaux (CARTER et coll., 1964 ; DEARBORN et coll., 1976) et les microorganismes (LESTER et coll., 1974).

La classification des GSL, des bases et des acides gras constitutifs est reportée dans les tableaux 31, 32 et 33.

Le métabolisme des GSL est désormais bien établi.

c) Métabolisme des GSL.

Le métabolisme des GSL a fait l'objet de travaux difficiles provenant de l'insolubilité des substrats, de la solubilité des produits de réaction et de la nature des enzymes concernés ; ces enzymes sont en général fixés sur les membranes et insolubles dans les conditions habituelles (MOREL et BRAUN, 1972).

1-céramides : La synthèse des céramides, c'est à dire la formation d'une liaison entre une base à longue chaîne et un acide gras nécessite l'intervention d'acyltransférases spécifiques qui assurent et contrôlent la répartition des acides gras (MOREL et BRAUN, 1972). Inversement, leur dégradation est sous la dépendance de céramidases.

2-glycosylcéramides :

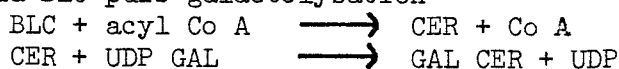
a. monoglycosylcéramides :

α) glucosylcéramides : leur biosynthèse, étape fondamentale pour les gangliosides, nécessite la présence d'UDP-glucose et d'un enzyme de glycosylation non spécifique de la nature du céramide substrat (c'est à dire de la nature des AG et BLC constitutifs).

Chez l'homme, 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).

β) galactosylcéramides : leur biosynthèse nécessite l'intervention de l'UDP-galactose ; il existe 2 voies métaboliques connues (BURTON et coll., 1958 ; MORELL et BRAUN, 1972).

1. acylation de la BLC puis galactolysation



TABEAU 31 :

CLASSIFICATION DES DIVERS GLYCOSPHINGOLIPIDES D'APRES WIEGANDT, 1971

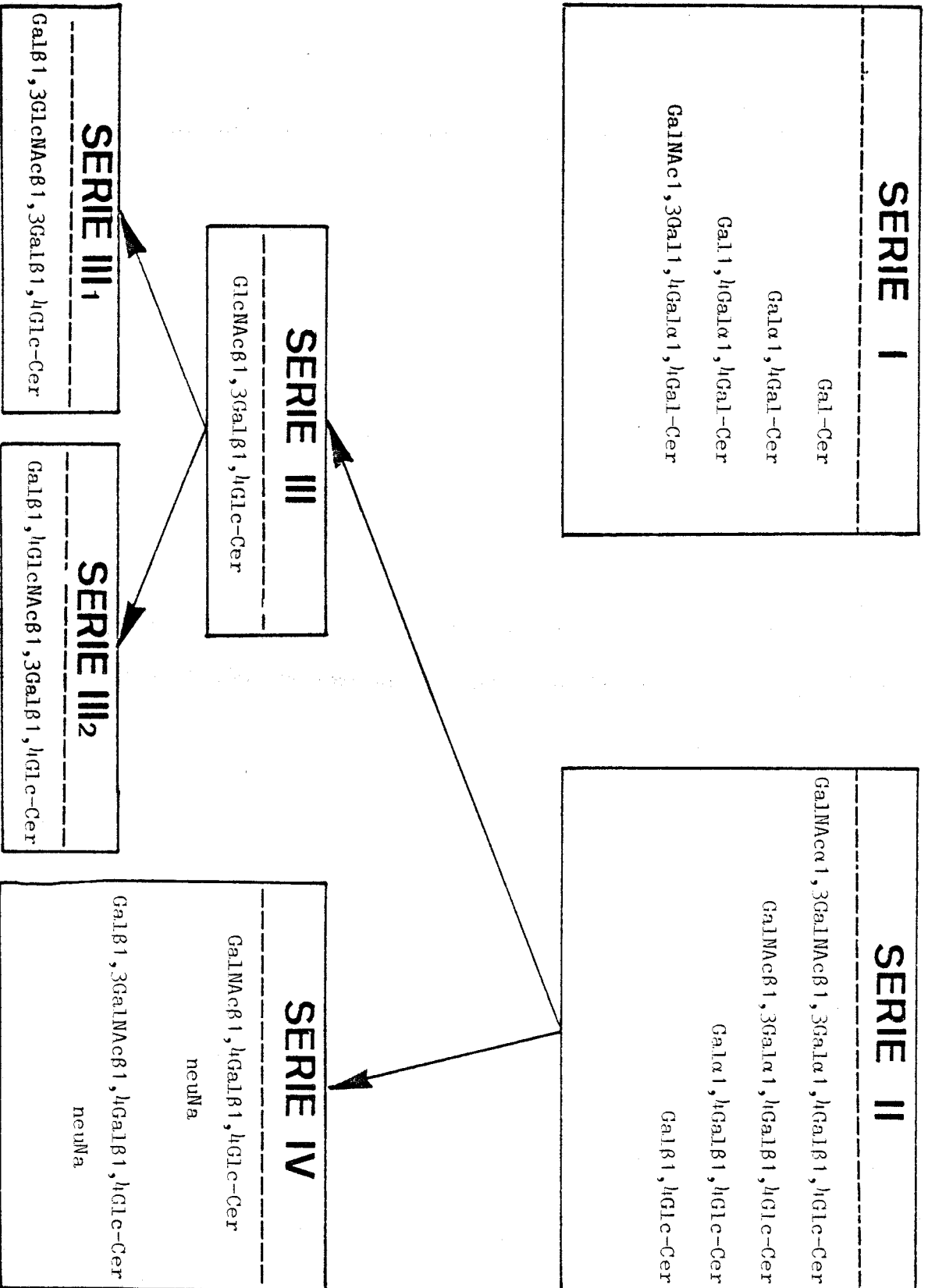
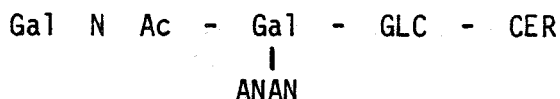


TABLEAU 32 :

CLASSIFICATION DES PRINCIPALES BASES A LONGUE CHAINE

Bases dihydroxylées		Bases trihydroxylées	
saturées	insaturées	saturées	insaturées
d18 : 0	d18 : 1 ⁴ trans	t18 : 0	t18 : 1 ⁸ trans
Sphinganine	Sphingénine	4-D-Hydroxy-sphinganine	4-D-Hydroxy-8-sphingénine
Dihydrosphingosine	Sphingosine	Phytosphingosine	Déhydro-phytosphingosine
$ \begin{array}{c} \text{CH}_2\text{OH} \\ \\ \text{HC-NH}_2 \\ \\ \text{HC-OH} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ (\text{CH}_2)_{10} \\ \\ \text{CH}_3 \end{array} $	$ \begin{array}{c} \text{CH}_2\text{OH} \\ \\ \text{HC-NH}_2 \\ \\ \text{HC-OH} \\ \\ \text{HC} \\ \\ \text{CH} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ (\text{CH}_2)_{10} \\ \\ \text{CH}_3 \end{array} $	$ \begin{array}{c} \text{CH}_2\text{OH} \\ \\ \text{HC-NH}_2 \\ \\ \text{HC-OH} \\ \\ \text{HC-OH} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ (\text{CH}_2)_{10} \\ \\ \text{CH}_3 \end{array} $	$ \begin{array}{c} \text{CH}_2\text{OH} \\ \\ \text{HC-NH}_2 \\ \\ \text{HC-OH} \\ \\ \text{HC-OH} \\ \\ (\text{CH}_2)_3 \\ \\ \text{HC} \\ \\ \text{CH} \\ \\ (\text{CH}_2)_8 \\ \\ \text{CH}_3 \end{array} $



Plusieurs voies métaboliques sont ensuite possibles et aboutissent aux di et trisialogangliosides (tableau de WIEGANDT, 1971).

b. catabolisme : la biodégradation se fait par libération successive d'unités monosaccharidiques. Les glycosidases concernées ont été isolées, leur pH optimum d'action est inférieur à 5 (WIEGANDT, 1971).

L'étude du métabolisme de ces constituants membranaires est un élément permettant de préciser certaines de leurs fonctions cellulaires.

d) Fonctions des glycosphingolipides.

Bien que les travaux sur les GSL soient relativement récents, leur rôle a été établi dans des processus cellulaires très variés, tant physiologiques que pathologiques.

1-les GSL, récepteurs des surfaces cellulaires : Les GSL partagent avec les glycoprotéines un rôle dans le comportement social des cellules qui dépend de l'adhésion, cellule à cellule, de constituants membranaires complémentaires (BURGER, 1974).

Les GSL et les glycoprotéines ont, au moins, deux caractéristiques communes qui les impliquent dans un rôle d'interaction cellulaire :

1) les résidus osidiques de ces deux types de molécules sont exposés à la surface cellulaire ;

2) ces résidus ont une énorme potentialité de diversité structurale.

Une telle diversité induit la spécificité de ces molécules de surface cellulaire qui peut gouverner les aspects sélectifs des interactions cellulaires (MAC GUIRE et BURDICK, 1975).

Les exemples les plus connus de résidus osidiques de surface contrôlant l'interaction cellulaire sont trouvés dans l'adhésion du bactériophage (ROBBINS et UCHIDA, 1962), les réactions de croisement entre bactéries (SNEATH et LEDERBERG, 1961), de levures (CRANDALL et coll., 1974) et les interactions cellulaires dans la différenciation tissulaire (BARBERA et coll., 1973). Leur rôle a été davantage analysé dans leur relation avec des molécules (protéines et glycoprotéines) spécifiques.

2-les GSL, récepteurs moléculaires :

a. réception de toxines bactériennes : ces toxines se fixent sélectivement sur les glycolipides de surface : cas du tétanos (CLOWES et coll., 1972), du botulisme (SIMPSON et RAPPORT, 1971), de l'entérotoxine d'*Escherichia coli* (HOLMGREN, 1973), du choléra (CUATRECASAS, 1973). Le cas du choléra a été particulièrement analysé car l'étude de la fixation de la toxine du choléra sur les GSL membranaires est un exemple probant de l'interaction entre une protéine et un glycolipide de surface ; CUATRECASAS a démontré que la toxine cholérique marquée à l'iode 125 se fixe très rapidement sur des membranes de foie de rat, de façon irréversible ; la liaison est inhibée à 50 % lorsque le milieu contient des sialoglycolipides et n'existe pas lorsque les membranes ont été traitées au préalable par le mélange chloroforme-méthanol. Par ailleurs, la fixation de la toxine cholérique est suivie d'effets intracellulaires : stimulation de l'adénylcyclase induisant une augmentation du taux de cAMP intracellulaire. HOLLENBERG et coll. (1974) ont établi une relation entre la fixation de la toxine, l'élévation de cAMP, l'inhibition de la synthèse d'ADN et le taux de GSL.

b. réception de l'interféron : des travaux récents ont mis en évidence que les glycolipides, et particulièrement le ganglioside GM₂, fonctionnent comme des récepteurs spécifiques de surface pour l'interféron. Cette glycoprotéine (DORNER et coll., 1973) est synthétisée par les cellules infectées par des virus et, lorsqu'elle se fixe à la surface d'autres cellules, induit des modifications intracellulaires qui bloquent la réplication virale (METZ, 1975) et la croissance de cellules normales ou tumorales (TAN, 1976). BESANCON et ANKEL (1974) ont démontré qu'une préparation de gangliosides et d'interféron bloque les effets de ces glycolipides et que le ganglioside est effectivement lié à l'interféron. De plus, les cellules traitées avec la phytohémagglutinine et la concanavoline A ne sont pas affectées par l'interféron : vraisemblablement, les lectines entrent en compétition avec l'interféron pour le site de liaison à la surface membranaire ; de façon remarquable, l'interaction de l'interféron avec son récepteur induit une activation de l'adénylcyclase (WEBER et STEWART, 1975).

c. réception d'hormones ou d'autres substances : certaines hormones se fixent sur les GSL membranaires : c'est le cas de la thyrotrophine (MULLIN et coll., 1976) : des gangliosides inhibent la fixation de la thyrotrophine marquée sur les membranes plasmiques de thyroïde bovine ; un des résultats de l'interaction de l'hormone avec son récepteur est l'activation du système adénylcyclase (MARSHALL et coll., 1976).

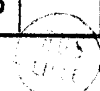
TABLEAU 33 :

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

nom commun	symboles	structure
acide laurique	12:0	$\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_{10}\text{COOH}$
» myristique	14:0	$\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_{12}\text{COOH}$
» palmitique	16:0	$\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_{14}\text{COOH}$
» stearique	18:0	$\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_{16}\text{COOH}$
» oléique	18:1(9c)	$\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$
» linoléique	18:2(9c,12c)	$\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_3(\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH})_2(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$
» linoléique	18:3(9c,12c,15c)	$\text{CH}_3-(\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH})_3(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$

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

ACIDES GRAS SATURES														
nbre pair de C		10:0		12:0		14:0		16:0		18:0		20:0	22:0	24:0
nbre impair de C	9:0		11:0		13:0		15:0		17:0		19:0			
ACIDES GRAS INSATURES														
Famille en Δ9														
Δ9-monoénoates						14:1		16:1		18:1				
Δ9-diénoates				13:1		15:1			17:1		18:2			
Δ9-triénoates									17:2		19:2			
									17:3		18:3			
Famille en ω9														
ω9-monoénoates						14:1		16:1		18:1		20:1	22:1	
ω9-diénoates										18:2		20:2		
Famille en ω6														
ω6-diénoates								16:2		18:2		20:2	22:2	
ω6-triénoates								16:3		18:3		20:3	22:3	
ω6-tétraénoates												20:4	22:4	
ω6-pentaénoates													22:5	
Famille en ω3														
ω3-triénoates								16:3		18:3		20:3		
ω3-tétraénoates								16:4		18:4		20:4	22:4	
ω3-pentaénoates												20:5	22:5	
ω3-héxaénoates													22:6	



LEDEEN (1977) a mis en évidence qu'il existe une analogie peptidique entre la chaîne β de la toxine cholérique et les subunités β d'hormones glycoprotéiques telles que la thyrotrophine, l'hormone lutéinisante, la gonadotrophine chorionique humaine et la FSH ; ces protéines pourraient utiliser un mécanisme commun basé sur des récepteurs gangliosidiques pour leur transport sur et dans les membranes ; plus généralement, une des fonctions des gangliosides pourrait être le transfert de l'information de l'extérieur vers l'intérieur de la cellule.

Enfin, les GSL et en particulier les gangliosides sont des récepteurs pour les facteurs d'inhibition des migrations des macrophages (HIGGINS et coll., 1976) et pour le virus de SANDAÏ (HAYWOOD, 1974).

d. les GSL, antigènes des groupes sanguins : depuis les travaux de HAKOMORI (1970, 1975), on sait que les antigènes liés à la membrane des érythrocytes sont des GSL. L'antigène de FORSMAN (GAHMBERG et HAKOMORI, 1975) et l'antigène des lymphocytes de souris (MILLER et ESSELMAN, 1975), correspondent à la séquence hydrocarbonée des glycolipides. Le groupe sanguin P est constitué de globoside dont la structure est connue, du céramide trihexoside (antigène P_k) et d'un antigène P_1 (GSL inconnu) (HAMERS et coll., 1978).

On a pu utiliser les propriétés immunochimiques des glycolipides (RAPPORT et GRAF, 1969 ; NIFDIECK, 1975 ; MARCUS et SCHWARTING, 1976) pour préparer des anticorps contre des GSL particuliers. L'utilisation d'un sérum anti-TGCer permet de détecter les TGCer dans le diagnostic prénatal de la maladie de FABRY.

ZALE (1978) a établi que c'est l'ose des MGCer qui détermine la spécificité de l'anticorps lorsqu'il prépare un anti-sérum contre le MGCer. En effet, il y a inhibition de l'agglutination par le glucose, le cellobiose et le méthylglucoside ; cependant, GRAF et RAPPORT (1974) ont montré que les acides gras peuvent exercer un rôle dans l'immunogénicité de l'haptène lipidique mais ne participent pas au site antigénique.

e. les GSL récepteurs de molécules impliquées dans la régulation de croissance : le fait que l'interaction de molécules telles les toxines, l'interféron, etc... avec les GSL (et en particulier les gangliosides) induit une élévation du niveau intracellulaire de l'AMPc, métabolite qui est fortement impliqué dans la régulation de croissance et la différenciation, suggère que d'autres glycolipides peuvent agir comme récepteurs pour des équivalents physiologiques des toxines ; c'est le cas, par exemple, pour des molécules normalement présentes dans le milieu cellulaire pouvant inhiber la croissance ou stimuler l'expression de fonctions de différenciation (WILLINGHAM, 1976).

TABLEAU 34 :

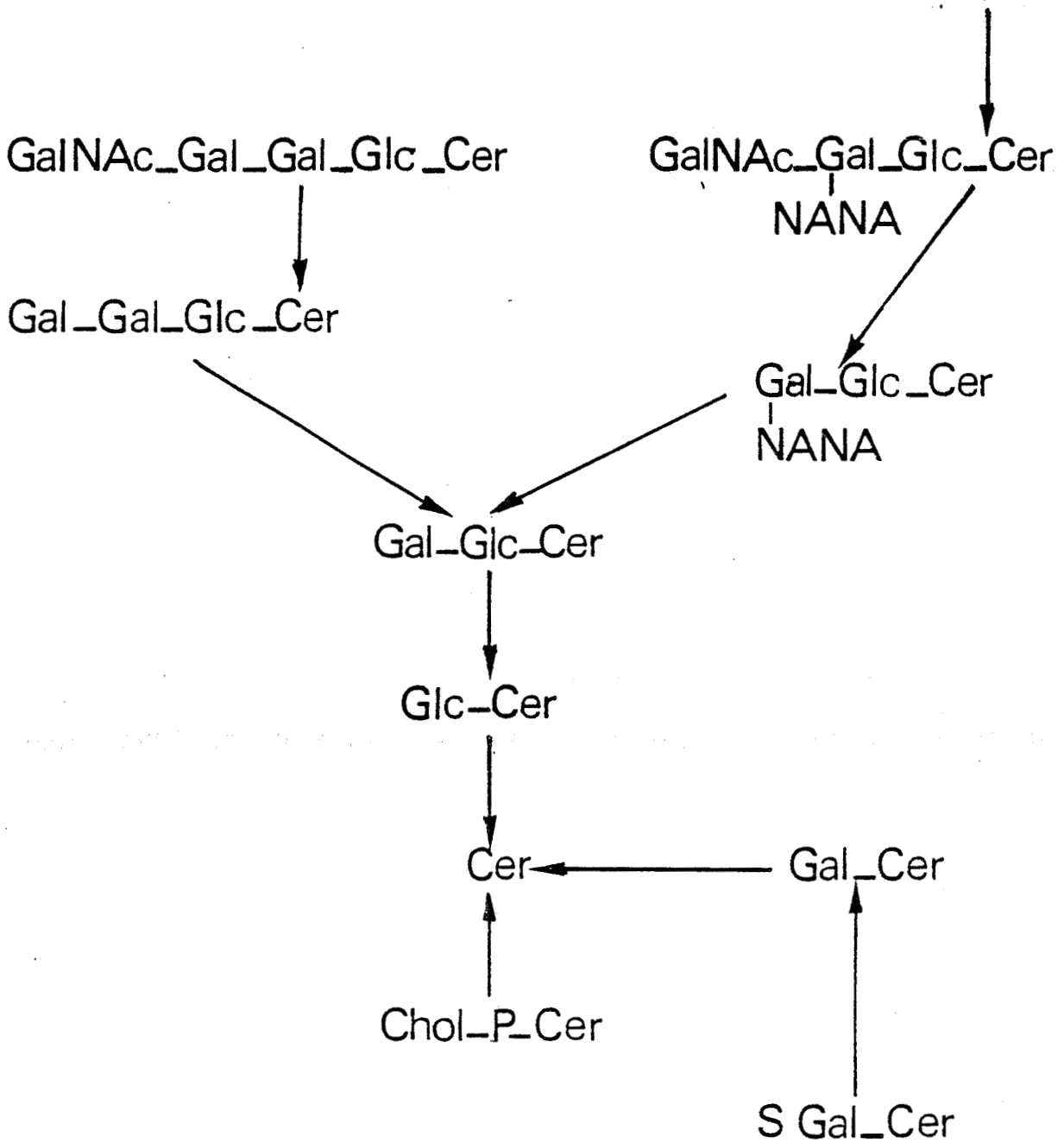


Schéma de la dégradation métabolique
des sphingolipides complexes



GACTO et STEINER (1976) en particulier ont montré la relation qui existe entre la synthèse des fucolipides III et IV et la croissance d'une population cellulaire ; lorsque les cellules sont en voie de croissance, la synthèse de ces composés est diminuée de façon considérable par rapport à celle qui existe lorsque le nombre de cellules est élevé : la régulation de la croissance qui intervient serait la réponse au contact intercellulaire.

Il y a donc une relation entre la synthèse de fucolipides complexes et d'autres glycolipides et l'augmentation du nombre des cellules.

La régulation de la croissance étant perturbée dans les processus tumoraux, on trouve également une relation entre la tumorigénèse et/ou le taux et/ou la structure des GSL.

3-GSL et tumorigénèse : On a vu que des GSL nouveaux apparaissent lorsque la densité cellulaire augmente ; cette synthèse disparaît lors de l'induction d'une transformation maligne. Ce phénomène se retrouve souvent et concerne les glycolipides mais non les glycoprotéines (GRIMES, 1977). Des altérations du métabolisme des glycolipides complexes ont été mis en évidence dans les adénocarcinomes humains et dans d'autres cas de transformations tumorales (HAKOMORI et MURAHAMI, 1968). Ces auteurs ont établi que les chaînes osidiques des cellules transformées sont moins complexes et moins importants que ceux des cellules normales ; on retrouve un phénomène analogue dans les cellules transformées soit par des virus soit chimiquement : dans tous les cas, le changement s'effectue dans un sens identique : il y a diminution du taux de GSL complexes ; la modification est spécifique de la cellule et non de l'agent causal.

La transformation résulterait de la modification des activités des glycosyltransférases dans la chaîne de biosynthèse ce qui aurait pour effet l'accumulation des GSL se situant en amont du blocage enzymatique (BRADY et FISHMAN, 1974). Le blocage pourrait se situer au niveau de la transcription et/ou se manifesterait par la production d'enzymes inactifs ; seuls, les enzymes de synthèse seraient concernés, les activités cataboliques restant intactes (CUMAR et coll., 1970).

SWEETLEY et DAWSON (1969) ont mis en évidence que le phénomène concernait à la fois les glycosyl et les acyltransférases ; ainsi, les acides palmitique (C16 : 0), stéarique (C18 : 0) et oléique (C18 : 1) qui sont les principaux acides gras des oligohexocéramides ont une teneur moindre dans les GSL complexes (à longs chaînes osidiques) ils sont remplacés par les acides béhénique (C22 : 0), lignocérique (C24 : 0) et nervonique (C26 : 1) qu'on ne retrouve qu'à l'état de traces dans les Cer et MGCer.

Il y a donc une réduction des AG en C16 et C18 dans les GSL complexes et une augmentation concomitante des AG en C20, 22, etc...

Des variations identiques dans la composition en acides gras des GSL dont la copule osidique s'allonge ont été retrouvées par ailleurs (SIDDIQUI et HAKOMORI, 1970 ; WEINSTEIN et coll., 1970 ; YOGEEESWARAN et coll., 1970).

Enfin, différents auteurs (HAKOMORI et JEANLOZ, 1964 ; WATANABE et coll., 1976) ont détecté des GSL spécifiques de cellules tumorales : un GSL contenant du fucose, du galactose et du glucose à partir de l'adénocarcinome gastrique pour les premiers et un fucosylcéramide à partir d'un carcinome du colon pour WATANABE et coll. : la concentration de ce GSL dépend d'ailleurs du degré de malignité ; ces auteurs confirment par ailleurs l'accumulation de fucolipides à courte chaîne aux dépens des plus complexes. L'altération du métabolisme des GSL serait le dernier évènement du processus malin.

Par ailleurs, les GSL, par la nature de leurs 3 composants (copule osidique, BLC, AG) et leur localisation membranaire peuvent jouer des rôles dans des fonctions moins spécifiques.

4-autres fonctions des GSL :

a. rôles de la copule osidique :

α) transport d'ions : les sulfolipides, comme les phospholipides membranaires, par les charges négatives qu'ils portent ont une affinité prononcée pour les cations (KUIPER, 1975) ; l'hypothèse selon laquelle les sulfolipides jouent un rôle dans les phénomènes de transport ionique est généralement admise (MORELL et BRAUN, 1972). Pour les cations monovalents, la distribution identique des sulfatides et des ATPases Na et K dépendantes dans les tissus animaux (KARLSSON, 1970) ou végétaux (KUIPER, 1975) qui sont le siège d'un transport actif de sodium est un argument en faveur de leur rôle porteur ou récepteur d'ions. KUIPER attribue également un rôle aux sulfolipides dans le transport des ions divalents. Seule la partie polaire du GSL peut être impliquée dans les transports du cation, la partie lipidique est en relation avec les autres fonctions membranaires.

β) réactions avec les lectines : l'utilisation des liaisons entre les membranes et les lectines donne des informations intéressantes sur l'architecture moléculaire des surfaces cellulaires. La signification biologique des modifications dans la liaison entre les lectines et les structures membranaires pour différents états fonctionnels tels que ceux liés à la transformation est encore controversée (BROWNELL, 1977). La liaison avec les lectines permet de comparer les constituants saccharidiques des membranes ; par

exemple le D mannose, la N-acétylglucosamine, le β D galactose et la N-acétyl-galactosamine, monosaccharides participant à des structures oligosaccharidiques des glycoprotéines et des glycolipides ont été identifiés.

La liaison des lectines à la surface cellulaire est un outil précieux pour élucider la nature chimique de la partie saccharidique ; les premières études ont montré que les lectines se fixent d'abord sur les oses terminaux de la chaîne oligosaccharidique mais d'autres travaux ont prouvé que quelques lectines se fixent à l'intérieur de la copule oligosaccharidique (NICHOLSON, 1974).

b. rôles de la partie lipophile :

α) transport d'eau : la perméabilité membranaire à l'eau est tributaire de la composition des feuilletts lipidiques ; non seulement la nature des AG entrant dans la composition des GSL intervient, mais également la structure des BLC. KARLSSON et coll. (1958, 1973) ont montré que les bases trihydroxylées des sulfolipides des tubules rénaux sont responsables de leur imperméabilité.

β) transport des non électrolytes : de la même façon, il existe une relation entre la perméabilité aux substances non électrolytes, le degré de saturation et la longueur de chaîne des bases et des acides gras : plus le degré de désaturation augmente, plus la plasticité de la membrane est élevée et plus le transfert est important.

γ) rôles de la composition en acides gras des lipides membranaires : nous avons déjà exposé que les conceptions modernes sur les membranes envisagent celles-ci non comme inertes mais dans un état dynamique dans lequel des parties de lipides membranaires passent constamment d'un état ordonné à un état fluide (SINGER et NICHOLSON, 1972). Plusieurs facteurs contribuent à la fluidité de la membrane, notamment une valeur du rapport AG polyinsaturés/saturés faible se traduit par une fluidité moindre que celles ayant un rapport élevé (OVERATH et TRÄUBLE, 1973).

De plus, les AG interviennent dans les phénomènes immunitaires : RESCH et FARBER (1975) ont mis en évidence l'augmentation de l'incorporation d'acétate marqué dans les AG après stimulation des lymphocytes par la phytohémagglutinine (d'autres réponses sont également enregistrées telles la production d'anticorps ou la stimulation de la division cellulaire). Plus précisément, la composition en AG présente une augmentation de la teneur en acide arachidonique. L'activité acyltransférase est également augmentée après la liaison avec une lectine. L'un des premiers effets de l'activation lymphocytaire se traduit donc par une modification de la composition en

acides gras (augmentation de la fluidité membranaire par l'augmentation du pourcentage d'insaturation). De plus, après stimulation lymphocytaire, il y a également augmentation de la perméabilité aux ions (QUASTEL et KAPLAN, 1971).

Inversement, les acides gras exogènes peuvent induire une modification de la réponse immunitaire *in vitro* ; les acides gras insaturés (linoléique et arachidonique) sont d'ailleurs plus actifs que les acides palmitique et stéarique (MERTIN et HUGHES, 1975).

Il faut signaler que les acides arachidonique et linoléique sont des précurseurs immédiats des prostaglandines qui jouent un rôle dans la réponse immunitaire (les prostaglandines provoquent en particulier une diminution de la capacité de la phytohémagglutinine à stimuler les cellules lymphocytaires).

Enfin, d'autres auteurs ont mis en évidence des modifications de perméabilité membranaire en relation avec le pourcentage d'acides gras saturés (DAVIS et SILBERT, 1974), avec la longueur des chaînes des AG ainsi qu'entre la structure des AG et l'adhésion (CURTIS et HILL, 1979) ou le comportement thermique des GSL (CALHOUN et SHIPLEY, 1979).

Chez les végétaux, TSO (1964) a montré le rôle des AG à chaîne courte dans l'inhibition de la croissance du bourgeon axillaire de *Nicotiana tabacum* et STOWE (1960) a suggéré une fonction possible du contrôle de croissance par les esters méthyliques d'acides gras.

Le rôle de la structure des BLC : PASCHER (1976) a mis l'accent sur l'importance de la structure des bases dans différentes fonctions : la présence des groupes hydroxy (2 ou 3) et d'une liaison amide donnent aux céramides le double rôle de donneur ou d'accepteur d'hydrogène ; ce fait augmente la polarité du composé lipidique et donc son interaction avec l'eau ; si ces groupes établissent des liaisons hydrogène latérales à l'intérieur de la matrice lipidique, ils augmentent considérablement la stabilité et l'imperméabilité de la membrane ; on observe, en effet, un plus grand nombre de groupes hydroxy dans les membranes des organes exposés à des "stress" physiques (KARLSSON et coll., 1973 ; SMITH et coll., 1975).

Un moyen de créer une plus grande stabilité de la membrane est donc d'augmenter les liaisons hydrogène latérales par addition de groupes OH aux BLC des sphingolipides : ceci aboutit à créer une barrière plus efficace pour les molécules polaires et non polaires. Pour ce qui est du rôle antigénique, la réduction de la double liaison de la sphingosine



n'altère pas la capacité immunologique des GSL, seuls les groupes amino et NH_2 de la sphingosine sont concernés.

5-conclusions : L'aspect le plus important, dans le cadre de cette étude, parmi les fonctions attribuées au GSL, nous semble être leur implication dans les mécanismes de reconnaissance entre cellules ou entre cellules et molécules effectrices, suivis d'une modification du métabolisme intracellulaire.

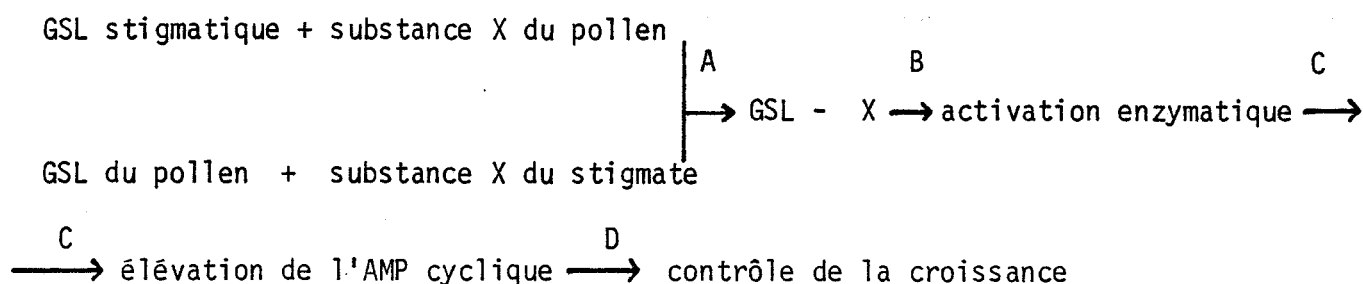
De plus, les GSL interviennent dans le processus de perméabilité cellulaire et dans les mécanismes de contrôle de croissance par l'intermédiaire de la synthèse d'AMP cyclique qui régule lui même la croissance. Leur rôle peut donc s'exprimer au cours du phénomène de pollinisation chez les Angiospermes, en particulier dans l'étape de reconnaissance et dans les phénomènes membranaires qui conditionnent le rejet de l'autotube pollinique.

e) GSL et pollinisation.

Lorsqu'un grain de pollen arrive au contact d'une papille stigmatique, la première étape, préalable à la fécondation, consiste en une reconnaissance entre les structures polliniques et les cellules du pistil. Si le gamétophyte est reconnu comme appartenant à la même espèce que la plante réceptrice, il se forme un tube pollinique, dont la régulation de la croissance est assurée dans le tissu conducteur du style, à condition que les allèles S soient différents dans le pollen et le style.

La présence de la paroi pectocellulosique à la surface des cellules des papilles stigmatiques d'une part et la paroi complexe des grains de pollen de l'autre, empêchent le contact entre les plasmalemmes. Mais, si l'on postule que tous les éléments de spécificité sont localisés sur la membrane plasmique (comme chez les animaux) et lorsque l'on sait qu'il y a diffusion de substances spécifiques au travers de l'intine ou/et de l'exine de la paroi du grain de pollen au moment de la pollinisation, on peut faire une analogie entre les rôles des GSL dans les règnes animaux et végétaux ; compte-tenu de cette remarque, on peut penser que les GSL peuvent intervenir dans le phénomène d'autoincompatibilité :

- 1) soit dans le processus de reconnaissance : ceci implique la participation de GSL spécifiques (non seulement au niveau du pollen et du stigmate, mais aussi de chacun des allèles S) ;
- 2) soit dans la régulation de la croissance du tube pollinique. Dans ce cas, le schéma de contrôle serait le suivant :



L'absence de la substance spécifique va induire ou non l'autoincompatibilité (aux niveaux A, B ou C) ;

3) après un temps de latence, correspondant à une restructuration métabolique, la croissance du tube pollinique serait bloquée ou stimulée par une modification de la perméabilité de la membrane du tube pollinique (l'autopollinisation induisant une perte de la perméabilité de la membrane interdisant tout apport nutritif) ; la modification de la perméabilité dépendant de la structure des AG et des BLC des GSL constituants de la matrice lipidique ;

4) la modification du potentiel de membrane (LINSKENS et SPANJERS, 1973), au cours de la réaction incompatible pourrait être due (tout ou en partie) à l'activité de cryptes à GSL qui accumulent les ions ;

5) la production de callose, caractéristique de la réaction incompatible proviendrait (tout ou partie) de l'activation de glycosyltransférases induisant une diminution de la teneur en GSL complexes.

Toutes ces hypothèses impliquent une extraction sélective, une identification et une étude structurale comparative des GSL des pollens et des styles vierges de différents géotypes ainsi que l'analyse de leurs modifications éventuelles après auto ou xénopollinisation.

f) Analyse des glycosphingolipides.

1-conditions expérimentales : Elles doivent permettre l'extraction sélective des GSL, sans altération de leur structure par des méthodes trop drastiques ou par action des lipases endogènes activées au cours de l'extraction ; pour éviter ces écueils, nous avons utilisé les méthodes proposées par KARLSSON (1973) en procédant le plus rapidement possible sur du matériel congelé, et en stockant les différents extraits à -20°C sous atmosphère d'azote (DELBART, 1978, sur *Petunia hybrida*).

2-extraction des lipides totaux : Les lipides des styles et des pollens sont extraits selon la méthode de FOLCH (1957) modifiée par KARLSSON (1973) (fiche technique n° 20) par le mélange $\text{CHCl}_3\text{-CH}_3\text{OH}$ (2 : 1, v/v) à raison de 20 ml de solvant par gramme de tissu congelé pendant 20 minutes. Après 3 homogénéisations au Potter et filtration, le résidu est chauffé à reflux dans le mélange

CHCl_3 - CH_3OH (1 : 1, v/v). Les surnageants sont mélangés et lavés par une solution CHCl_3 - CH_3OH -Na Cl 9 % (3 : 47 : 48, v/v/v) : les lipides totaux recueillis après décantation de la phase inférieure chloroformique, sont évaporés à sec puis repris dans un petit volume de CHCl_3 - CH_3OH (2 : 1, v/v) et conservés à -20°C sous atmosphère d'azote (tableau 35).

3-obtention des glycosphingolipides totaux : Ils sont séparés des autres lipides (alcools estérifiés) grâce à l'alcali résistance de la liaison amide, la liaison ester étant lysée par saponification en milieu basique : c'est le protocole préconisé par KARLSSON (1973) (fiche technique n° 21) qui a été choisi pour sa fiabilité : hydrolyse alcaline douce en présence de potasse alcoolique (KOH 0,1 M dans le mélange CH_3OH - H_2O , 9 : 1, v/v) pendant 18 heures sous atmosphère d'azote et à l'obscurité ; après arrêt de la réaction et déphasage par un mélange de chloroforme et d'eau, les GSL sont recueillis dans la phase organique (tableau 36).

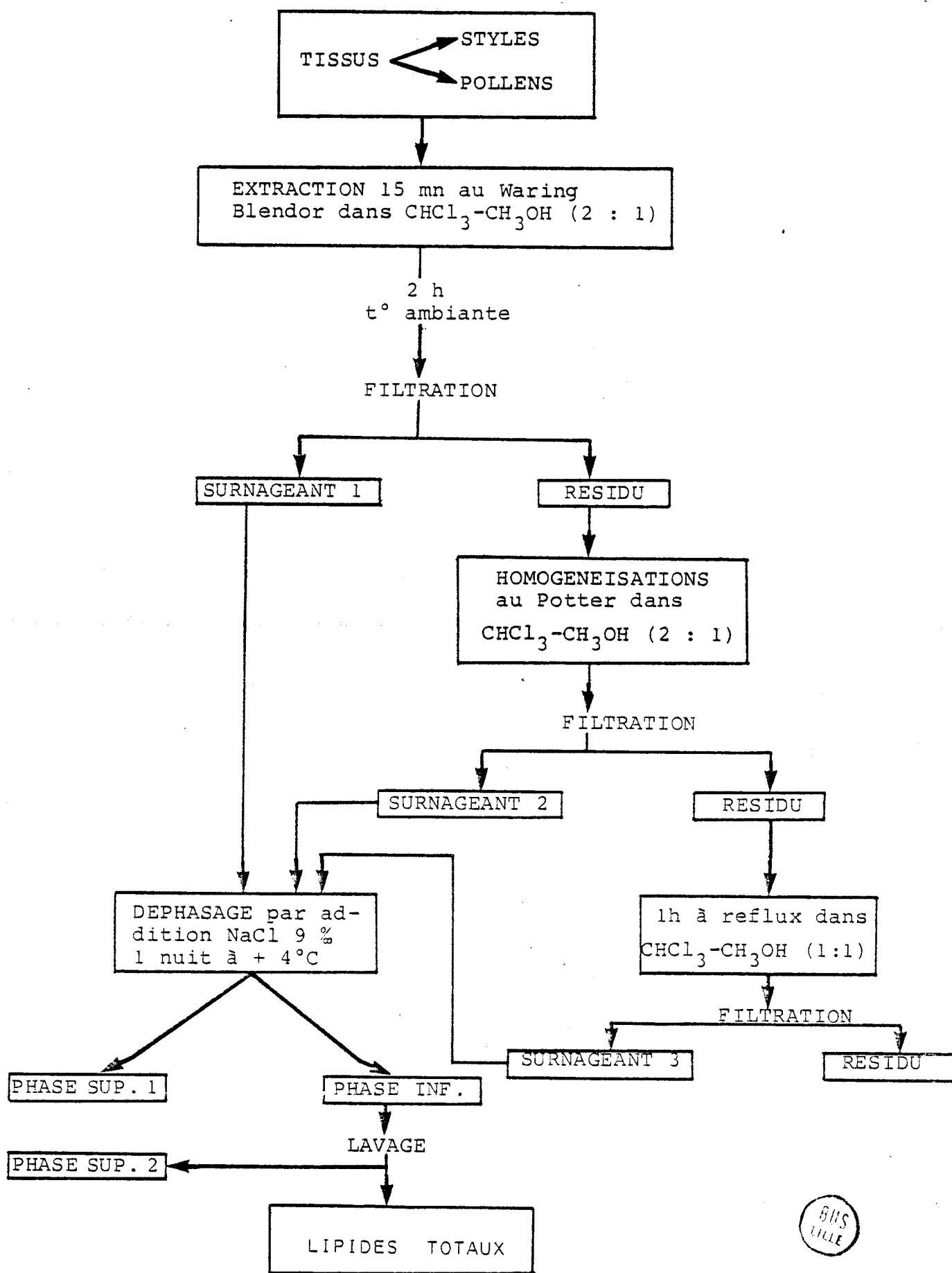
L'absence de GSL dans la phase supérieure est vérifiée par chromatographie en couche mince dans le système solvant CHCl_3 - CH_3OH - H_2O (65 : 25 : 4, v/v/v) et révélation par des réactifs spécifiques tels que l' α naphthol ou la benzidine. L'absence de base libre, significative d'une hydrolyse intempestive des GSL est contrôlée par pulvérisation de ninhydrine.

4-purification des GSL totaux : Dans la phase organique subsistent des contaminants de nature lipidique : acides gras, cholestérol, pigments caroténoïdes en particulier. Une étape de purification s'avère indispensable, elle peut être réalisée par chromatographie sur colonne d'acide silicique (méthode de KARLSSON, 1973 ; fiche technique n° 22) équilibrée au chloroforme (10 ml/g d'acide silicique avec une charge lipidique < 100 mg). Par passage de solvants de polarités croissantes, on obtient 3 fractions (tableau 37) :

- une fraction A contenant les acides gras, le cholestérol, les stérols ainsi que des pigments après le premier solvant (chloroforme) ;
- une fraction B après passage de CHCl_3 - CH_3OH (1 : 3, v/v) contenant les GSL ;
- une fraction C (élution par le méthanol pur) contenant les lipides polaires encore adsorbés sur l'acide silicique.

La composition de chacune des fractions est analysée en CCM dans le système solvant CHCl_3 - CH_3OH - H_2O (65 : 25 : 4, v/v/v) en présence de témoins ce qui permet de vérifier la présence des GSL dans les fractions B et C, qui sont regroupées ensemble.

TABLEAU 35 : PROTOCOLE D'EXTRACTION



BIS
LILLE

5-dosage des GSL totaux : Il a été réalisé par la technique de NAOI (1974) (fiche technique n° 26) qui repose sur l'évaluation de l'intensité de fluorescence émise par la sphingosine incluse dans un complexe formé avec la fluo-rescamine : cette intensité est proportionnelle à la quantité de sphingosine. Après hydrolyse acide des GSL, la sphingosine est extraite sélectivement par le diéthyléther puis complexée avec la fluo-rescamine : la mesure de l'intensité de fluorescence est réalisée 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 (fiche technique n° 26).

Les résultats des dosages fluorimétriques des GSL totaux des différents extraits de pollen et de styles vierges auto et xénopollinisés sont exprimés en nanomoles de GSL par gramme de tissu congelé.

6-fractionnement en GSL neutres et acides : Les glycosphingolipides totaux peuvent être séparés par chromatographie d'échanges d'ions en fonction du caractère plus ou moins polaire et/ou acide de leur molécule : le "degré" de liaison sur l'échangeur d'ions dépend du nombre de résidus polaires, la force ionique variable de l'éluant permettra de les décrocher de façon sélective (tableau 37).

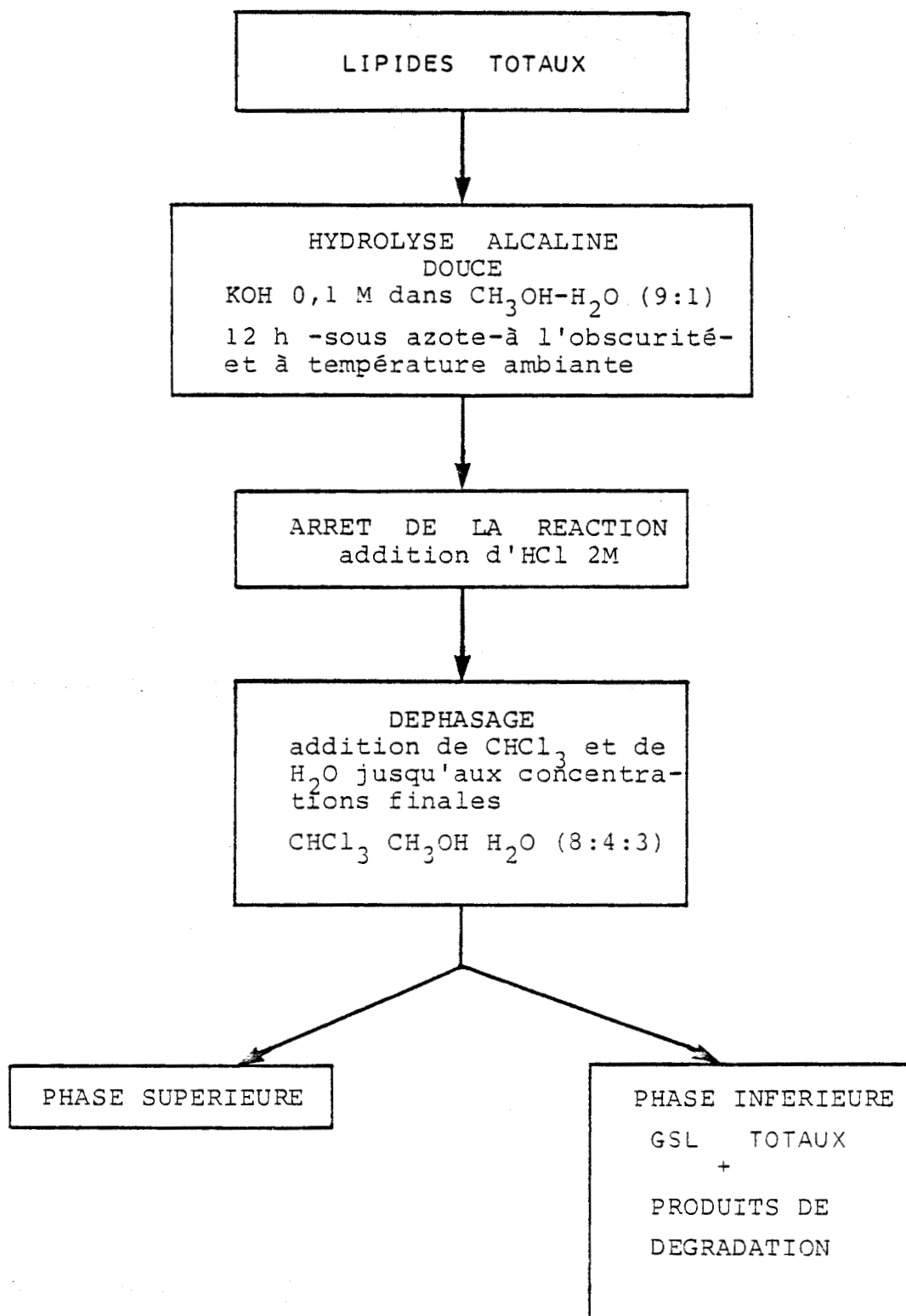
La fraction B + C est chromatographiée sur diéthylaminoéthylcellulose (DEAE cellulose). Cette dernière, préparée selon la méthode de KARAN et LESTER (1975), est utilisée sous forme acétate et équilibrée dans les mélanges solvants CHCl_3 - CH_3OH (2 : 1, v/v) selon le protocole de KARLSSON et coll. (1973), (fiche technique n° 23). La chromatographie est réalisée dans les conditions suivantes :

- charge en lipides : 50 mg par gramme de DEAE cellulose ;
- élution avec les solvants suivants :
 - CHCl_3 - CH_3OH (2 : 1, v/v) 100 ml/g de cellulose ;
 - CH_3OH contenant 5 % de LiCl (p/v), 25 ml par gramme de cellulose.

On obtient 2 fractions D et E contenant respectivement les GSL neutres et acides comme l'établit la CCM sur gel de solice dans le système solvant : CH_3Cl_3 - CH_3OH - H_2O (65 : 25 : 4, v/v/v) en présence de témoins. La fraction E correspond essentiellement aux sulfatides ; elle contient également quelques pigments.

7-séparation des divers glycosphingolipides neutres : La fraction D précédente, contenant tous les GSL neutres, est fractionnée par chromatographie d'adsorption sur colonne d'acide silicique (fiche technique n° 24). Les GSL sont élués en

TABLEAU 36 : OBTENTION DES GLYCOSPHINGOLIPIDES TOTAUX



fonction de leur polarité, c'est à dire grosso modo en fonction du nombre de résidus osidiques contenus dans leur molécule : ceci est vrai pour les GSL apolaires et peu polaires, mais lorsque le nombre de résidus osidiques augmente, il peut y avoir "chevauchement" entre deux solvants successifs.

Les mélanges éluants utilisés sont, dans l'ordre :

- CHCl_3 - CH_3OH 98 : 2 v/v, correspondant à la fraction 1
- CHCl_3 - CH_3OH 92 : 8 v/v, correspondant à la fraction 2
- CHCl_3 - CH_3OH 85 : 15 v/v, correspondant à la fraction 3
- CHCl_3 - CH_3OH 45 : 55 v/v, correspondant à la fraction 4
- CH_3OH , correspondant à la fraction 5.

L'identification des fractions est effectuée par chromatographie en couche mince avec révélation spécifique à l' α naphthol, en présence de témoins, dans les conditions décrites précédemment.

La séparation des GSL neutres en fonction du nombre de résidus osidiques n'étant pas parfaite, une étape supplémentaire de purification s'avère indispensable.

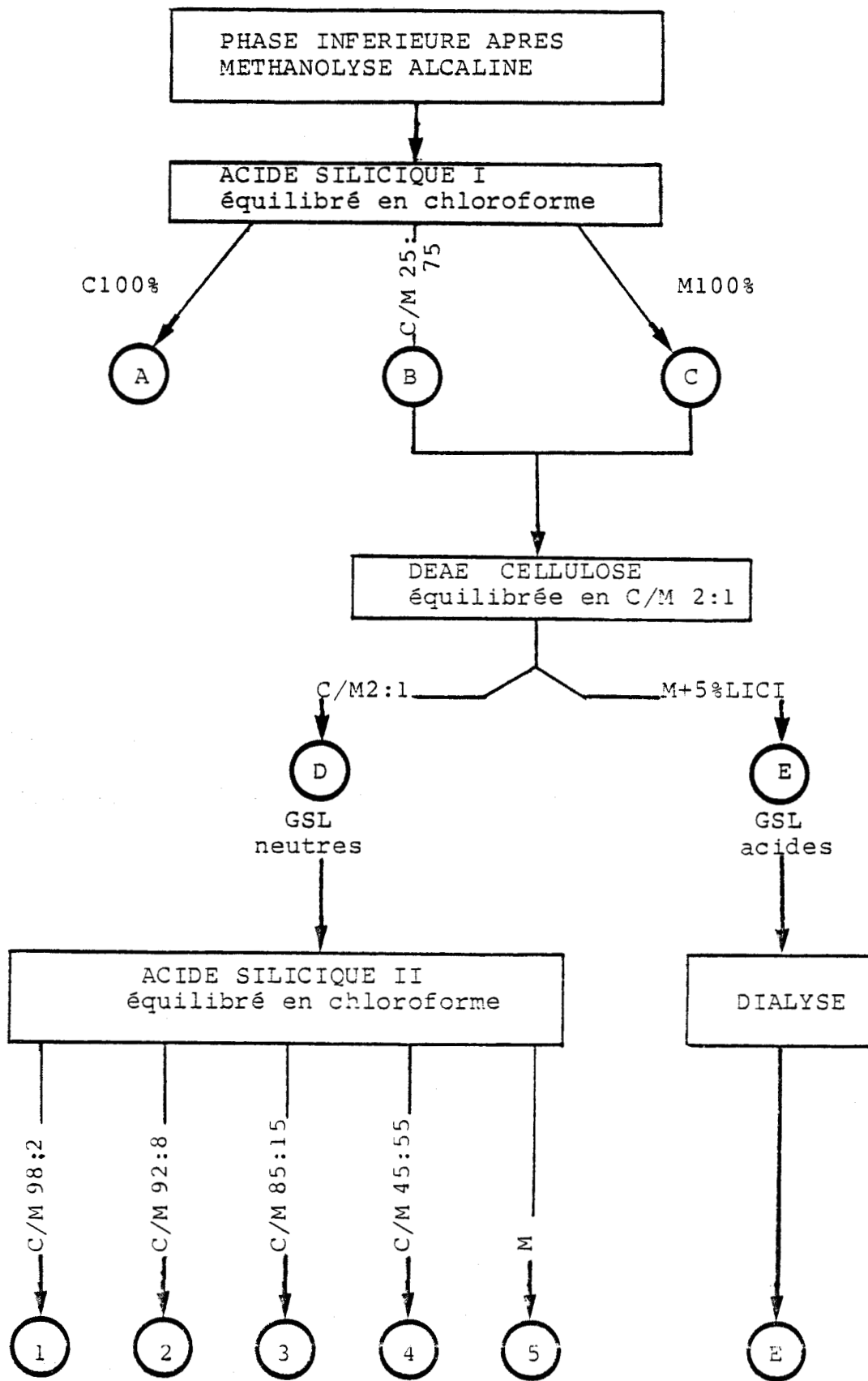
8-chromatographie préparative en couche mince : Les fractions F_1 à F_5 précédentes sont évaporées à sec et reprises respectivement dans un volume minimum du mélange $\text{CH}_3\text{OH}-\text{CHCl}_3$ (1 : 2, v/v) qui est déposé en ligne sur une plaque de CCM de gel de silice G activée 30 minutes à 120°C .

Le mélange solvant utilisé est $\text{CHCl}_3-\text{CH}_3\text{OH}-\text{H}_2\text{O}$ (65 : 25 : 4, v/v/v), la révélation s'effectue par pulvérisation d'une solution de rhodamine 6G et lecture en U.V., en présence de témoins.

La localisation des taches étant faite de façon précise, celles-ci sont grattées et les GSL sont élués sélectivement (fiche technique n° 25). Une nouvelle vérification de la pureté des constituants est réalisée par CCM.

Nous nous sommes limités aux 5 GSL neutres : CER, MGCer, DGCer, TGCer et TrGCer car le système de purification utilisé ne permet pas une bonne séparation des lipides plus polaires (dans le système solvant utilisé, plus le nombre de résidus osidiques croît, plus les R_f sont petits et voisins les uns les autres : au-dessus de 4 unités monosaccharidiques, la séparation et l'identification des GSL est impossible).

TABLEAU 37 : FRACTIONNEMENT DES GLYCOSPHINGOLIPIDES TOTAUX



BUS
LILLE

9-résultats expérimentaux (BRIS et DELBART, 1978 ; BRIS et coll., 1981) :
Ils sont répertoriés dans le tableau 38.

a. glycosphingolipides totaux : l'analyse des résultats obtenus est réalisée en relation avec la nature du matériel biologique (pollen ou style), le génotype (allèles S), le type de pollinisation (compatible ou incompatible).

α) GSL totaux du pollen et du style non pollinisé : les résultats sont exprimés en nanogrammes de GSL par gramme de tissu ; ils correspondent à la moyenne de 5 mesures effectuées au spectrofluorimètre.

Pollen :

S ₁ (S ₁ S ₁).....	94,4 ± 1,7
Bb (S ₁ S ₂).....	91,3 ± 0,9
Bg (S ₂ S ₄).....	87,7 ± 2,7

Styles non pollinisés :

S ₁ (S ₁ S ₁).....	20,6 ± 1,1
Bb (S ₁ S ₂).....	23,3 ± 2,4
Bg (S ₂ S ₄).....	25 ± 1,6

Ces résultats démontrent qu'il existe une remarquable constante de la teneur en GSL pour un matériel donné ; les faibles variations observées pour chacun des génotypes ne sont pas interprétables à ce stade de l'analyse.

Pour tous les clônes étudiés, le pollen se caractérise globalement par une plus grande richesse en GSL que les styles, les pourcentages respectifs des teneurs en GSL des styles par rapport au pollen s'établissent de la façon suivante :

Styles S ₁ (S ₁ S ₁).....	21,8 %
Styles Bb (S ₁ S ₂).....	25,5 %
Styles Bg (S ₂ S ₄).....	28,6 %.

La prise en compte de ces valeurs permet d'évaluer l'apport de la pollinisation.

β) apport de la pollinisation :
autopollinisation : dans ce cas, l'analyse porte sur des styles ayant reçu un apport de pollen possédant un allèle d'incompatibilité commun avec le style. Les teneurs en GSL totaux sont les suivantes :

Styles S ₁ @	40,6 ± 0,5
Styles Bb @	60 ± 3,2
Styles Bg @	44 ± 3,7

Pour analyser les modifications induites dans la teneur en GSL par l'autopollinisation, il est nécessaire de comparer les résultats obtenus à ceux qui résulteraient de l'ensemble : GSL du style vierge + GSL de la "charge" pollinique ; or, les mesures faites sur 30 styles après pollinisation montrent que l'augmentation pondérale due à l'apport de pollen est de l'ordre de $1,8 \pm 0,2 \%$ du poids du style. En comparant les valeurs obtenues pour les styles non pollinisés et pour le pollen, il est évident que l'autopollinisation induit une synthèse accrue de GSL.

Exemple :

$S_1 \text{ } \theta$: 40,6 nanomoles/g

$S_1 \text{ v} + \text{charge pollinique}$: $20,6 + \frac{1,8 \times 94,4}{100} = 22,5$ nanomoles/g.

xénopollinisation : dans ce cas, les tubes polliniques croissent à l'intérieur du tissu conducteur du style ; leur importance pondérale est difficile à chiffrer mais les résultats montrent que la teneur en GSL augmente considérablement :

$S_1 S_1 \times S_2 S_4$	70,5 \pm 2,1 nanomoles de GSL/g de tissu
$S_2 S_4 \times S_1 S_1$	61,5 \pm 1,9 nanomoles de GSL/g de tissu
$S_1 S_2 \times S_2 S_4$	48,5 \pm 2,7 nanomoles de GSL/g de tissu.

L'orientation du métabolisme vers la synthèse de GSL est encore accrue par rapport à l'autopollinisation.

Dans le cas du croisement demi compatible, il faut noter que cet accroissement est moins élevé que celui induit par l'autopollinisation.

En résumé, le pollen, quel que soit l'allèle S dont il est porteur, est plus riche en GSL que le style non pollinisé ; la pollinisation a pour effet une augmentation de la biosynthèse des GSL, cet effet est plus marqué lorsque le croisement est possible.

La modification du métabolisme des GSL peut être précisée par l'analyse plus détaillée de ces constituants membranaires.

b. comparaison GSL neutres et GSL acides :

α) au niveau du pollen et du style non pollinisé : le tableau 38 permet de constater :

1-le pourcentage de GSL acides est plus élevé dans le pollen que dans le style vierge ;

2-il n'existe pas de relation notable entre la présence d'un allèle d'incompatibilité et la teneur en GSL acides ou neutres.

TABLEAU 38 : RÉPARTITION DES DIFFÉRENTES CLASSES DE GLYCOSPHINGOLIPIDES DANS LE POLLEN ET DANS LES STYLES EN FONCTION DE LA POLLINISATION.



	S ₁				Bh				Pg			
	pollen	S ₁ S ₁ vierge	S ₁ S ₁ xS ₁ S ₁ autopol.	S ₁ S ₁ xS ₂ S ₂ xéropol.	pollen	S ₁ S ₂ vierge	S ₁ S ₂ xS ₁ S ₂ autopol.	S ₁ S ₂ xS ₂ S ₂ xéropol.	pollen	S ₂ S ₁ vierge	S ₂ S ₁ xS ₂ S ₁ autopol.	S ₂ S ₁ xS ₁ S ₁ xéropol.
(nanomoles/g) glycosphingolipides totaux	94,4	20,6	40,6	70,5	91,3	23,3	60	48,5	87,7	25,1	44	61,5
F ₁	5,4	7	13	16	6,3	10	23	7	6,7	10	13	13
F ₂	31	8	18	40	32	5	20	30	28	8	18	35
F ₃	15	1,8	4	8	16	2	8	5	13	3	5	6
F ₄	6	1,5	1,2	2,5	5	2	2	1,8	5	1,5	0,7	2,5
F ₅	3	1	1,8	2	5	1,8	2	3	3	1,1	1,3	3
E	34	1,3	2,6	2	27	3	5	2	32	1,5	6	2
% dans chaque classe	2,5	33	31	26	7	36,8	27	15	18	50	13	23
F ₁	35	39	44	55	35	20	46	61	47	15	70	58
F ₂	15	9	9,8	12	17	8	9	10	10	7	7	10
F ₃	6,5	6	3	4	5	10	6	4	6	8	2,6	4
F ₄	3,5	5	4	3	5	8	6	6	6	7	5,1	4
E	37,5	6	6	7	30	16	6	5	44	12	2,6	7
taux relatifs par rapport aux styles vierge	0,8	1	1,9	2,3	0,7	1	2,3	0,7	0,7	1	1,3	1,3
F ₁	3,9	1	2,3	5	6,4	1	4	6	3,5	1	2,3	4,4
F ₂	8,3	1	2,2	4,4	8	1	4	2,5	4,3	1	1,7	2
F ₃	4	1	0,8	1,7	2,8	1	0,8	0,7	3,3	1	0,5	1,7
F ₄	3	1	1,5	2	2,8	1	1,1	1,7	2,7	1	1,1	2,8
F ₅	26	1	2	1,5	9	1	1,7	0,7	21	1	4	1,3

β) apport de la pollinisation :

autopollinisation :

	GSL neutres	GSL acides	% $\frac{\text{GSL acides}}{\text{GSL totaux}}$
S ₁ ⊕	38	2,6	6,4
Bb ⊕	55	5	9,09
Bg ⊕	38	6	13,6

Les pourcentages des GSL acides sont comparables à ceux observés dans les styles vierges.

xénopollinisation :

	GSL neutres	GSL acides	% $\frac{\text{GSL acides}}{\text{GSL totaux}}$
S ₁ S ₁ × S ₂ S ₄	68,5	2,0	2,8
S ₂ S ₄ × S ₁ S ₁	59,5	2,0	3,3
S ₁ S ₁ × S ₁ S ₂	46,8	5,0	10,6

Les variations enregistrées indiquent une baisse relative des GSL acides au cours de la pollinisation. Le cas de la demi compatibilité est à souligner : le taux des GSL acides reste alors élevé.

La comparaison des différentes catégories des GSL permet de préciser les variations enregistrées au niveau du pollen et du style vierge ainsi qu'au cours du processus de pollinisation.

c. comparaison des différentes classes de GSL neutres :

α) céramides :

dans les différents pollens et styles : le tableau suivant rapporte les valeurs obtenues, exprimées successivement en nanomoles de céramides par gramme de tissu et en pourcentage relatif par rapport aux GSL totaux.

	S ₁ S ₁		S ₁ S ₂		S ₂ S ₄	
	nmoles/g	%	nmoles/g	%	nmoles/g	%
Pollen	5,4	5,7	6,3	6,9	7,0	7,6
Styles vierges	7,0	33,9	10,0	42,9	10,0	39,8

Les variations observées sont faibles pour les différents géotypes d'un même matériel (pollen ou style). Les styles sont relativement plus riches en céramides que les pollens.

apport de la pollinisation : les résultats, exprimés de la même façon, présentent les variations suivantes :

	S_1S_1		S_1S_2		S_2S_4	
	nmoles/g	%	nmoles/g	%	nmoles/g	%
Autopol.	13	32,0	23	38,3	13	29,5
Xénopol.	16	22,7	7	14,4	13	21,1

Après autopollinisation, la teneur en céramides est relativement élevée, les résultats trouvés sont comparables à ceux présentés par les styles non pollinisés : en xénopollinisation, par contre, alors que le taux en GSL totaux est plus important, la proportion relative de céramides a tendance à baisser.

β) monoglycosylcéramides :

pollen et styles :

	S_1S_1		S_1S_2		S_2S_4	
	nmoles/g	%	nmoles/g	%	nmoles/g	%
Pollen	31	32,8	32	35,0	28	31,9
Styles vierges	8	38,8	5	21,4	8	31,8

En valeur absolue, le pollen est plus riche que le style mais la proportion de MG Cer reste identique dans les deux types de matériel.

évolution après pollinisation :

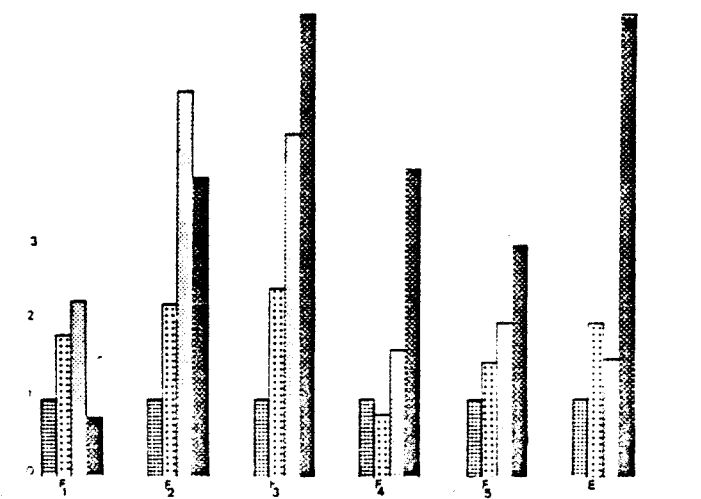
	S_1S_1		S_1S_2		S_2S_4	
	nmoles/g	%	nmoles/g	%	nmoles/g	%
Autopol.	18	44,3	20	33,3	18	40,9
Xénopol.	40	56,7	30	61,8	35	56,9

On constate une forte orientation du métabolisme vers la synthèse de MG Cer, cet effet est plus marqué pour la xénopollinisation (60 % des GSL totaux pour les seuls MG Cer).

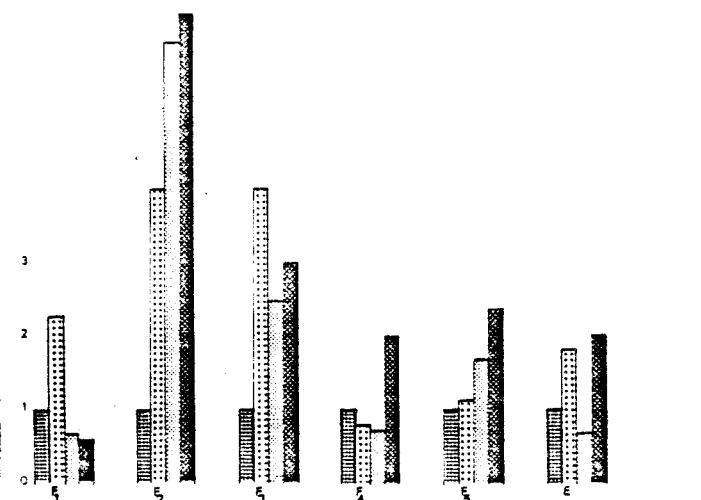
γ) diglycosylcéramides :

pollen et styles :

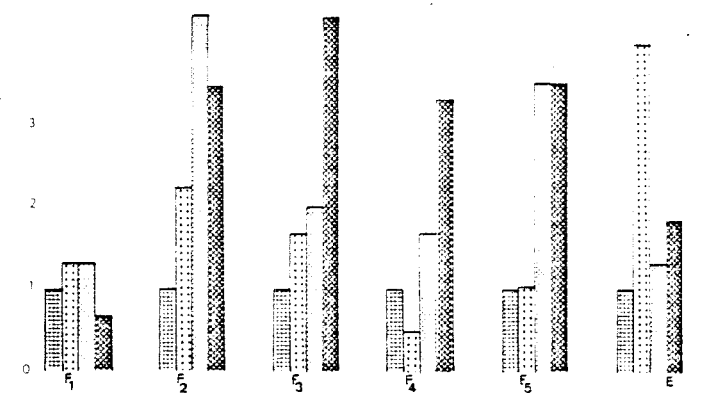
	S_1S_1		S_1S_2		S_2S_4	
	nmoles/g	%	nmoles/g	%	nmoles/g	%
Pollen	15	15,9	16	17,5	13	14,8
Styles vierges	1,8	8,7	2	8,6	3	11,9



$S_1S_1 (S_1)$



$S_1S_2 (Bb)$



$S_2S_4 (Bg)$

TABLEAU 39 : Taux relatifs des glycosphingolipides comparés à ceux des styles vierges (teneur pour les styles vierges égale à 1).



styles vierges



styles autopollinisés



styles xétopollinisés



pollen

Le pourcentage de diglycosylcéramides est plus élevé dans le pollen que dans le style vierge alors que le taux de GSL du pollen est déjà lui-même relativement élevé par rapport au style.

évolution après pollinisation :

	S_1S_1		S_1S_2		S_2S_4	
	nmoles/g	%	nmoles/g	%	nmoles/g	%
Autopol.	4	9,85	8	13,3	5	11,4
Xénopol.	8	11,3	5	10,3	6	9,8

Dans les styles pollinisés, il y a augmentation de la teneur en diglycosylcéramides par rapport au style vierge ; cette variation relative est cependant faible. L'autopollinisation induit cependant une synthèse plus importante des DG Cer.

δ) triglycosylcéramides :
pollen et styles non pollinisés :

	S_1S_1		S_1S_2		S_2S_4	
	nmoles/g	%	nmoles/g	%	nmoles/g	%
Pollen	6	6,4	5	5,4	5	5,7
Styles vierges	1,5	7,3	2,5	10,7	1,5	6

La teneur relative en TG Cer est supérieure dans le style non pollinisé ; il est intéressant de savoir comment évoluent ces TG Cer après pollinisation.

évolution après pollinisation :

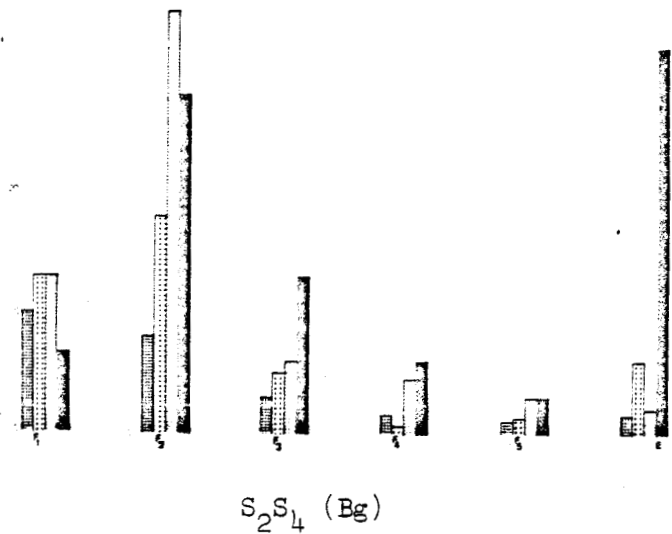
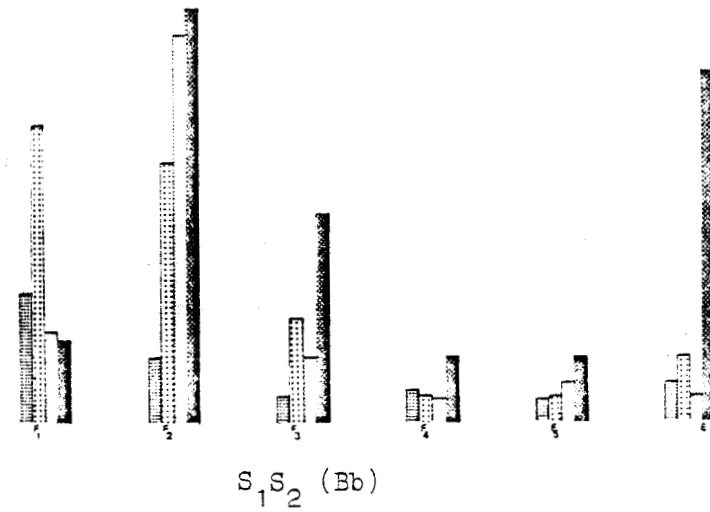
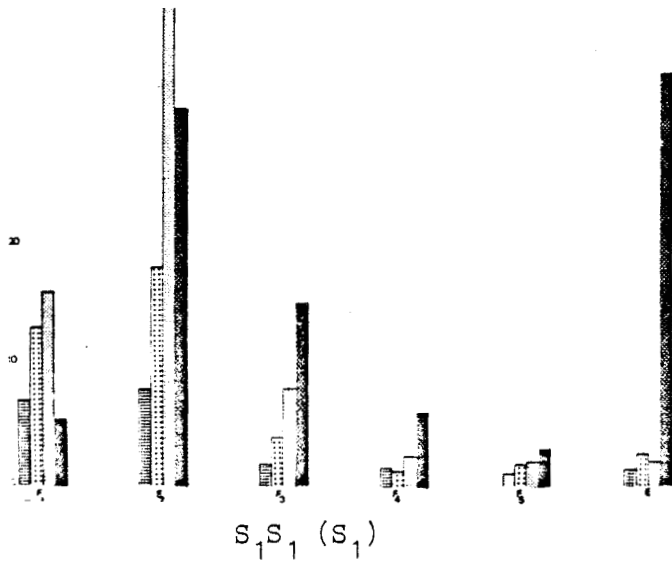
	S_1S_1		S_1S_2		S_2S_4	
	nmoles/g	%	nmoles/g	%	nmoles/g	%
Autopol.	1,2	2,9	2	3,3	0,7	1,6
Xénopol.	2,5	3,5	1,8	3,7	2,5	4,06

La xénopollinisation induit une diminution du pourcentage des TG Cer par rapport au style vierge qui sera plus accentuée en cas d'autopollinisation.

ε) tétraglycosylcéramides :
pollen et styles non pollinisés :



	S_1S_1		S_1S_2		S_2S_4	
	nmoles/g	%	nmoles/g	%	nmoles/g	%
Pollen	3	3,2	5	5,5	3	3,4
Styles vierges	1	4,8	1,8	7,7	1,1	4,4



La valeur relative en TrG Cer est supérieure dans le style.



BUS
LILLE

TABLEAU 40 : Teneur en glycosphingolipides des sous-fractions (nanomoles/g).

 styles vierges
 styles autopollinisés

 styles xéнопollinisés
 pollen

évolution après pollinisation :

	S_1S_1		S_1S_2		S_2S_4	
	nmoles/g	%	nmoles/g	%	nmoles/g	%
Autopol.	1,8	4,4	2	3,3	1,3	2,9
Xénopol.	2	2,8	3	6,2	3	4,9

Il y a réduction des TrGCer après autopollinisation et peu de variations de la teneur en TrGCer par rapport à celle des styles vierges en xénopollinisation.

En conclusion de cette analyse, il faut remarquer l'analogie du comportement des différentes classes de GSL au niveau du style et du pollen ainsi qu'au cours du processus de pollinisation, quels que soient les allèles d'incompatibilité dont ils sont porteurs.

En règle générale, la pollinisation induit dans les styles une augmentation des teneurs en GSL totaux ; cependant, il existe des variations importantes selon le type de pollinisation, compatible ou incompatible. L'auto-pollinisation provoque une augmentation notable des céramides et des monoglycosylcéramides tandis que la xénopollinisation a pour conséquence principale une augmentation des céramides et une teneur beaucoup plus importante en MGCer (quel que soit le génotype du style). Dans ce cas particulier du croisement demi compatible ($S_1S_2 \times S_2S_4$), l'augmentation caractéristique des MGCer est du même ordre de grandeur que pour le croisement compatible.

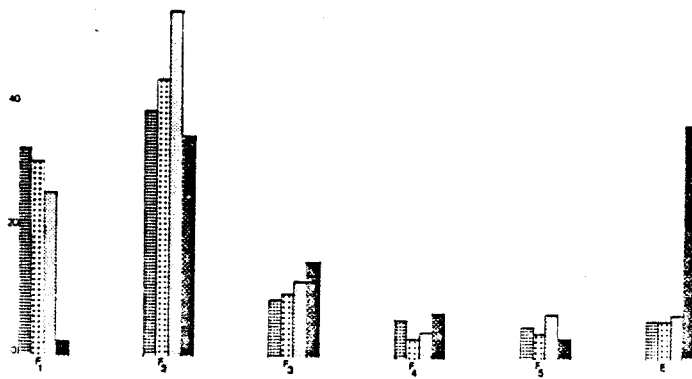
D'autre part, l'autopollinisation induit une forte diminution des teneurs en TGCer et TrGCer ; cette diminution des GSL complexes apparaît moins accentuée en cas de xénopollinisation.

Il est intéressant de comparer les taux relatifs des diverses classes de GSL par rapport à celles des styles vierges ; cette façon de procéder permet de visualiser rapidement les perturbations dues aux pollinisations (tableaux 39, 40 et 41).

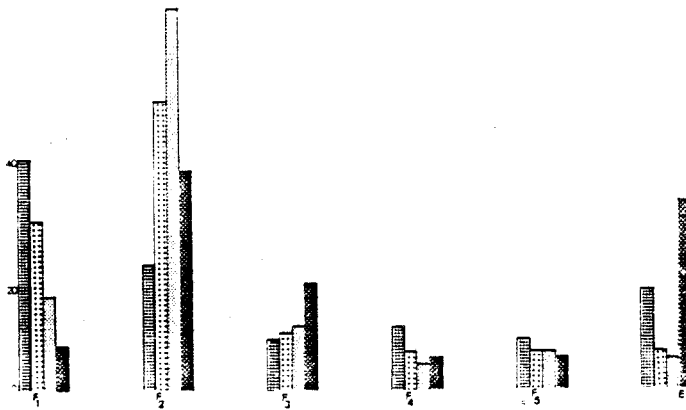
Pour les trois génotypes d'*Oenothera missouriensis* envisagés, les diagrammes montrent une augmentation relative des teneurs en céramides, mono et diglycosylcéramides, suivant la pollinisation (compatible ou non).

De façon remarquable, la fraction F_4 (triglycosylcéramides) présente une diminution dans le cas de l'autopollinisation alors que la somme des apports du style vierge et du pollen impliquerait une augmentation. Il existe donc une perturbation métabolique à ce niveau qui suit le phénomène d'auto-incompatibilité.

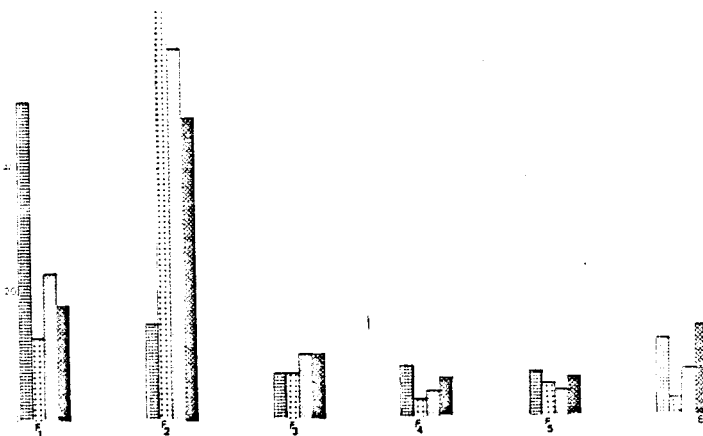
De plus, l'autopollinisation a pour conséquence une augmentation du pourcentage relatif des glycosphingolipides acides.



$S_1S_1 (S_1)$







$S_1S_2 (Bb)$



$S_2S_4 (Bg)$

TABLEAU 41: Pourcentage de glycosphingolipides dans chaque classe.

 styles vierges
 styles autopollinisés

 styles xéнопollinisés
 pollen



d. analyse statistique des résultats : une analyse de variance à 3 facteurs contrôlés : génotype, fraction, type de pollinisation, a été effectuée sur les résultats concernant les styles.

Elle démontre statistiquement les faits suivants (tableau 42) :

- 1) pour les différents génotypes envisagés, les moyennes teneurs en glycosphingolipides pour l'ensemble des 6 fractions ne sont pas significatives ;
- 2) les moyennes concernant la répartition des glycosphingolipides entre les différentes fractions présentent la variance la plus élevée ;
- 3) les moyennes entre les trois catégories de styles (vierges, autopollinisés, xéнопollinisés) sont hautement significatives : la composition en glycosphingolipides dépend donc essentiellement de l'état du style ;
- 4) l'interaction génotype-fraction est significative mais avec le coefficient le plus faible ce qui implique que la distribution des glycosphingolipides dépend aussi du génotype ;
- 5) l'interaction génotype-style est plus élevée que la précédente ce qui signifie que si la répartition des glycosphingolipides est différente pour les trois états du style, cette différence dépend du génotype ;
- 6) c'est l'interaction style-fraction qui est la plus élevée : une fraction est donc liée surtout à l'état du style (vierge, autopollinisé, xéнопollinisé) ;
- 7) l'interaction de 2ème ordre est significative : si on considère l'interaction génotype-style, celle-ci varie selon la fraction F envisagée et permet de mettre ainsi en évidence l'influence plus faible du génotype.

En conclusion de cette analyse, on peut dire que le paramètre le plus important dans la répartition des glycosphingolipides dans les différentes fractions est le processus de pollinisation ; l'intervention du paramètre "génotype" est beaucoup moins marquée.

g) Analyse des constituants des GSL neutres.

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

La technique d'hydrolyse utilisée (méthode de GAVER et SWEELEY, 1965) permet l'hydrolyse sans altération de la configuration des bases ; il s'agit d'une hydrolyse acide (solution méthanol chlorhydrique, HCl 1 N dans CH₃OH + 10 molécules d'eau) pendant 23 heures, sous atmosphère d'azote (fiche technique n° 27).

1-extraction des acides gras et composition en acides gras : L'hydrolysate est soumis à une extraction à l'hexane. La phase hexanique supérieure solubilise



TABLEAU 42 : ANALYSE DE VARIANCE DES TENEURS EN GLYCOSPHINGOLIPIDES
POUR LES STYLES VIERGES, AUTOPOLLINISÉS ET XÉNOPOLLINISÉS DE GÉNOTYPES
 S_1S_1 , S_1S_2 ET S_2S_4 .

Origine de la variation	degré de liberté	S^2	F
Génotype(A)	2	0,60	0,42 NS
Fraction(B)	5	2518,64	1749,06 ^{xxx}
Style(C)	2	886,73	615,78 ^{xxx}
Génotype x fraction (A x B)	10	14,54	10,10 ^{xxx}
Génotype x style (A x C)	4	96,06	66,71 ^{xxx}
Style x fraction (B x C)	10	479,13	332,73 ^{xxx}
A x B x C	20	23,05	16,01 ^{xxx}
Résiduelle	216	1,44	

les acides gras alors que les oses et les bases à longue chaîne restent dans la phase méthanolique acide. Après décantation et séparation, cette phase inférieure est 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 de la phase hexanique sont ensuite transestérifiés par le mélange méthanol-acide (fiche technique n° 18). 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° 18).

Après élution, les esters méthyliques d'acides gras sont repris par le sulfure de carbone et chromatographiés : chromatographie en phase gazeuse effectuée 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 (fiche technique n° 13). L'identification des acides gras est vérifiée par spectrométrie de masse (appareil Riber Mag 10-10) (fiche technique n° 32).

2-extraction des bases à longue chaîne (BLC) et analyse : 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.

a. obtention des BLC : les bases à longue chaîne sont extraites sélectivement par le diéthyl-éther en milieu alcalin, ce qui rend impossible toutes analyses de la partie osidique sur la phase inférieure (fiche technique n° 29).

b. obtention des dérivés dinitrophénylés : les BLC sont ensuite transformées en DNP-dérivés stables par la 1 fluoro 2-4-dinitrobenzène selon le protocole de KARLSSON (1970) (fiche technique n° 29). Les DNP dérivés sont ensuite purifiés par chromatographie en couche mince (fiche technique n° 29) afin d'éliminer excès de réactifs et impuretés.

c. analyse des bases : leur analyse sera complexe car elle implique plusieurs étapes après la stabilisation par dinitrophénylation.

TABLEAU 43 : RÉPARTITION DES ACIDES GRAS CONSTITUTIFS DES CÉRAMIDES.



matériel formule de Shortland	Styles				Pollen	
	vierges S1S1	autopollinisés S1S1 x S1S1	xénopollinisés S1S1 x S2S1	Alleles S1	Alleles S2 ou S1	
C12 : 0	0,41	0,58	1,22	0,26	1,04	
C12 : 1	-	-	-	-	-	
C13 : 0	2,44	0,63	1,72	0,03	0,92	
C13 : 1	0,11	-	0,01	0,03	0,05	
C14 : 0	3,70	2,74	1,27	0,96	1,01	
C14 : 1	1,51	0,25	0,48	0,26	0,29	
C15 : 0	2,36	1,55	1,35	0,53	0,80	
C15 : 1	0,47	0,25	0,33	0,32	0,31	
C16 : 0	26,88	23,03	19,78	11,93	13,71	
C16 : 1	7,15	5,26	3,85	2,21	2,93	
C17 : 0	2,01	1,63	0,99	1,24	0,56	
C17 : 1	1,20	1,21	0,50	0,53	0,30	
C18 : 0	13,54	16,66	9,47	5,38	6,17	
C18 : 1	21,23	24,94	14,31	10,71	10,61	
C18 : 2	6,46	4,26	11,55	4,36	6,01	
C18 : 3	3,69	1,47	23,43	45,53	44,77	
C19 : 0	-	0,47	0,88	0,66	0,05	
C19 : 1	-	-	-	-	-	
C20 : 0	3,63	2,28	5,27	8,73	7,60	
C20 : 1	1,53	0,76	1,20	3,41	0,24	
C21 : 0	0,46	0,68	0,19	0,39	-	
C21 : 1	-	4,89	-	0,31	-	
C22 : 0	1,21	6,45	1,75	2,21	2,71	
C22 : 1	-	-	-	-	-	
TOTAL	99,99	99,99	99,98	99,99	99,99	



TABLEAU 44 : RÉPARTITION DES ACIDES GRAS CONSTITUTIFS DES CÉRAMES.

Formule de matériel Shortland	StyLes vierges S_1S_2	StyLes autopollinisés $S_1S_2 \times S_1S_2$	StyLes xéнопollinisés $S_1S_2 \times S_2S_1$	Pollen Bb Allèles S_1 ou S_2	Pollen Bg Allèles S_2 ou S_1
C12 : 0 C12 : 1	5,11 -	4,03 -	4,58 -	0,60 -	1,04 -
C13 : 0 C13 : 1	7,32 -	4,58 0,40	10,06 -	0,03 0,22	0,92 0,05
C14 : 0 C14 : 1	1,89 0,71	2,74 0,88	1,79 0,40	1,30 0,35	1,01 0,29
C15 : 0 C15 : 1	2,43 0,54	1,42 0,47	3,02 -	1,21 0,24	0,80 0,31
C16 : 0 C16 : 1	22,03 [*] 5,74	28,29 5,07	30,60 3,75	10,58 [*] 3,73	13,71 2,93
C17 : 0 C17 : 1	1,50 1,08	1,98 1,26	2,06 0,83	1,03 0,85	0,56 0,30
C18 : 0 C18 : 1 C18 : 2 C18 : 3	9,78 18,51 [†] 3,40 2,52	14,64 17,99 2,30 1,93	14,71 11,91 4,22 4,75	6,10 10,91 5,05 46,27	6,17 10,91 6,01 44,72
C19 : 0 C19 : 1	0,55 -	0,21 -	0,59 -	- -	0,05 -
C20 : 0 C20 : 1	2,44 0,77	1,98 0,88	3,29 1,52	7,06 2,23	7,60 0,24
C21 : 0 C21 : 1	0,38 2,03	0,74 6,49	0,90 -	0,23 T	- -
C22 : 0 C22 : 1	11,25 -	1,71 -	1,01 -	1,99 -	2,73 -
TOTAL	99,98	99,99	99,99	99,98	99,99

* croisement demi-compatible.

TABLEAU 46 : RÉPARTITION DES ACIDES GRAS CONSTITUTIFS DES MONOGLYCOSYLCÉRAMIDES.



matériel formule de Shortland	Styles vierges S ₁ S ₁	Styles autopollinisés S ₁ S ₁ x S ₁ S ₁	Styles xéнопollinisés S ₁ S ₁ x S ₂ S ₄	Pollen S ₁ Allèles S ₁	Pollen Bg Allèles S ₂ ou S ₄
C12 : 0	0,69	0,68	1,42	0,09	-
C12 : 1	-	0,01	-	-	-
C13 : 0	0,06	0,62	2,56	0,34	0,68
C13 : 1	-	0,07	-	0,36	0,30
C14 : 0	0,99	2,87	6,80	0,50	1,05
C14 : 1	0,42	0,70	0,33	0,13	0,80
C15 : 0	1,58	2,72	1,42	0,28	0,90
C15 : 1	0,63	0,54	0,55	0,16	0,11
C16 : 0	28,06	22,92	25,51	20,73	21,04
C16 : 1	4	5,79	4,32	3,40	1
C17 : 0	2,88	2,02	1,00	1,30	0,95
C17 : 1	1,35	0,83	0,51	0,43	0,64
C18 : 0	33,92	23,35	10,65	5,44	4,56
C18 : 1	12,42	18,44	11,66	6,23	6,93
C18 : 2	2,06	2,41	12,16	1,68	1,38
C18 : 3	0,74	0,75	17,89	52,03	53,69
C19 : 0	0,53	0,45	-	0,10	-
C19 : 1	-	-	-	-	-
C20 : 0	2,05	1,24	2	3,80	3,07
C20 : 1	0,39	0,15	-	0,95	-
C21 : 0	6,88	2,98	0,59	1,29	1,88
C21 : 1	-	-	-	0,05	-
C22 : 0	0,34	10,45	0,62	0,70	1,02
C22 : 1	-	-	-	-	-
TOTAL	99,99	99,99	99,99	99,99	100

TABLEAU 47 : RÉPARTITION DES ACIDES GRAS CONSTITUTIFS DES MONOGLYCOSYL-CÉRAMIDES.



formule de Shortland	matériel	Styles vierges S1S2	Styles autopollinisés S1S2 x S1S2	Styles xéнопollinisés S1S2 x S2S1	Pollen Bb Allèles S1 ou S2	Pollen Bg Allèles S2 ou S1
C12 : 0		0,91	1,01	1,23	0,08	-
C12 : 1		-	-	0,39	-	-
C13 : 0		0,06	0,26	0,18	0,15	0,68
C13 : 1		-	0,06	0,05	0,22	0,30
C14 : 0		2,25	1,24	2,45	0,30	1,05
C14 : 1		0,45	0,57	0,79	0,12	0,80
C15 : 0		2,72	2,09	2,49	0,09	0,90
C15 : 1		0,35	0,49	0,69	0,31	0,11
C16 : 0		28,55	31,75	30,72	18,80	21,04
C16 : 1		4,96	4,73	7,83	2,25	1
C17 : 0		2,01	2,44	2,15	0,50	0,95
C17 : 1		0,79	1,66	1,32	0,15	0,64
C18 : 0		32,41	21,72	17,49	5,32	4,56
C18 : 1		13,22	17,21	15,86	6,27	6,93
C18 : 2		2,15	4,21	11,89	4,30	1,38
C18 : 3		0,61	5,20	1,47	56,31	53,69
C19 : 0		0,18	0,04	-	-	-
C19 : 1		-	-	-	-	-
C20 : 0		2,43	1,14	-	2,18	3,07
C20 : 1		0,64	0,53	0,94	0,56	-
C21 : 0		4,52	1,46	-	1,37	1,88
C21 : 1		-	-	2,05	0,32	-
C22 : 0		0,76	2,20	-	0,38	1,01
C22 : 1		-	-	-	-	-
TOTAL		99,98	99,99	99,99	99,98	99,99

* Croisement demi-compatible

TABLEAU 48 : RÉPARTITION DES ACIDES GRAS CONSTITUTIFS DES MONOGLYCOSYLCÉRAMIDES.

matériel formule de Shortland	Styles vierges S_2S_4	Styles autopollinisés $S_2S_4 \times S_2S_4$	Styles xéнопollinisés $S_2S_4 \times S_1S_1$	Pollen Bg Allèles S_2 ou S_4	Pollen S_1 Allèles S_1
C12 : 0	1,80	2,11	-	-	0,09
C12 : 1	-	0,03	-	-	-
C13 : 0	0,05	1,06	0,86	0,68	0,34
C13 : 1	-	0,01	0,65	0,30	0,36
C14 : 0	0,30	1,44	1,42	1,05	0,50
C14 : 1	0,19	0,55	0,95	0,80	0,13
C15 : 0	1,33	1,82	0,98	0,90	0,28
C15 : 1	0,25	0,81	0,88	0,11	0,16
C16 : 0	33,37	51,72	25,32	21,04	20,73
C16 : 1	4,16	6,22	5,14	i	3,40
C17 : 0	3,33	1,52	1,32	0,95	1,30
C17 : 1	1,08	0,84	0,83	0,64	0,43
C18 : 0	33,15	15,76	13,54	4,56	5,44
C18 : 1	7,62	15,39	25,24	6,93	6,23
C18 : 2	1,48	5,87	9,56	1,38	1,68
C18 : 3	0,49	1,33	10,63	53,69	52,03
C19 : 0	0,62	0,36	-	-	0,10
C19 : 1	-	-	-	-	-
C20 : 0	3,25	2,87	1,50	3,07	3,80
C20 : 1	0,20	1,08	0,08	-	0,95
C21 : 0	4,86	3,22	0,40	1,88	1,29
C21 : 1	1,18	-	0,24	-	0,05
C22 : 0	1,28	5,98	0,44	1,01	0,70
C22 : 1	-	-	-	-	-
TOTAL	99,99	99,99	99,99	99,99	99,99

TABLEAU 49 : RÉPARTITION DES ACIDES GRAS CONSTITUTIFS DES DIGLYCOSYLCERAMIDES.



formule de Shortland	matériel	Styles vierges $S_1 S_1$	Styles autopollinisés $S_1 S_1 \times S_1 S_1$	Styles xéнопollinisés $S_1 S_1 \times S_2 S_1$	Pollen S_1 Allèle S_1	Pollen Bg Allèles S_2 ou S_1
C12 : 0		0,46	8,70	0,23	1,90	0,64
C12 : 1		0,01	0,16	0,04	0,23	0,05
C13 : 0		0,11	0,33	0,02	0,41	0,05
C13 : 1		0,17	11,61	0,03	1,49	0,21
C14 : 0		0,15	2,81	0,55	1,86	1,99
C14 : 1		0,06	0,74	0,16	0,46	0,51
C15 : 0		0,50	1,12	0,70	0,68	1,98
C15 : 1		0,06	1,16	0,19	0,37	1,55
C16 : 0		40,48	28,19	19,60	31,87	36,72
C16 : 1		2,78	5,37	3,15	6,15	6,52
C17 : 0		1,19	1,19	1,17	1,53	1,33
C17 : 1		0,54	1,17	0,51	0,88	1,06
C18 : 0		17,04	11,59	10,22	10,60	8,32
C18 : 1		18,06	13,21	7,86	10,30	9,45
C18 : 2		6,30	3,53	20,70	2,13	4,74
C18 : 3		1,42	0,70	28,65	13,93	10,91
C19 : 0		4,39	1,43	-	-	-
C19 : 1		-	-	-	-	-
C20 : 0		4,57	2,76	3,65	5,84	5,72
C20 : 1		1,18	1,86	1,59	4,39	8,24
C21 : 0		0,05	-	0,16	0,10	-
C21 : 1		-	-	-	-	-
C22 : 0		0,38	2,35	0,81	4,87	-
C22 : 1		-	-	-	-	-
TOTAL		99,99	99,98	99,99	99,99	99,99

TABLEAU 50 : RÉPARTITION DES ACIDES GRAS CONSTITUTIFS DES DIGLYCOSYLÉRAMIDES.



matériel formule de Shortland	Styles vierges S_1S_2	Styles autopollinisés $S_1S_2 \times S_1S_2$	Styles xéнопollinisés $S_1S_2 \times S_2S_1$	Pollen Bb Allèles S_1 ou S_2	Pollen Bg Allèles S_2 ou S_1
C12 : 0	3,21	2,59	1,95	0,22	0,64
C12 : 1	-	0,24	0,09	0,04	0,05
C13 : 0	0,45	0,19	0,11	0,05	0,05
C13 : 1	1,16	0,66	0,83	0,07	0,21
C14 : 0	3,03	1,29	0,63	0,93	1,99
C14 : 1	0,76	0,30	0,35	0,23	0,51
C15 : 0	4,68	1,97	1,49	0,75	1,98
C15 : 1	1,48	1,41	0,91	0,54	1,55
C16 : 0	43,42	28,39	29,59	56,98	36,62
C16 : 1	4,96	3,11	8,05	5,21	6,52
C17 : 0	2,69	1,76	2,72	1,06	1,33
C17 : 1	1,36	1,18	0,72	0,65	1,06
C18 : 0	21,82	23,47	21,63	14,35	8,32
C18 : 1	7,56	10,26	21,26	4,74	9,45
C18 : 2	2,17	2,07	1,64	3,07	4,74
C18 : 3	1,24	1,38	-	6,41	10,91
C19 : 0	-	-	-	-	-
C19 : 1	-	-	-	-	-
C20 : 0	-	1,29	-	2,37	5,72
C20 : 1	-	3,36	-	0,49	8,24
C21 : 0	-	-	-	-	-
C21 : 1	-	-	8,01	-	-
C22 : 0	-	15,07	-	1,83	-
C22 : 1	-	-	-	-	-
TOTAL	99,99	99,99	99,98	99,99	

* Croisement demi-compatible

TABLEAU 51 : RÉPARTITION DES ACIDES GRAS CONSTITUTIFS DES DIGLYCOSYLCÉRAMES.

matériel formule de Shortland	Styles vierges S_2S_4	Styles autopollinisés $S_2S_4 \times S_2S_4$	Styles xéнопollinisés $S_2S_4 \times S_1S_1$	Pollen Bg Allèles S_2 ou S_4	Pollen S_1 Allèles S_1
C12 : 0	2,46	1,71	5,37	0,64	1,90
C12 : 1	0,40	0,22	0,35	0,05	0,23
C13 : 0	0,42	1,31	0,31	0,05	0,41
C13 : 1	0,90	1,51	0,67	0,21	1,49
C14 : 0	2,90	1,21	1,34	1,99	1,86
C14 : 1	0,83	0,62	0,78	0,51	0,46
C15 : 0	3,06	1,43	2,28	1,98	0,68
C15 : 1	1,37	0,67	1,18	1,55	0,37
C16 : 0	38,50	29,59	29,14	36,72	31,87
C16 : 1	9,63	7,47	4,03	6,52	6,15
C17 : 0	1,08	1,60	1,50	1,33	1,53
C17 : 1	0,83	1,30	1,02	1,06	0,88
C18 : 0	16,59	22,49	15,03	8,32	10,60
C18 : 1	19,51	16,82	10,60	9,45	10,30
C18 : 2	1,81	3,88	7,14	4,74	2,13
C18 : 3	-	1,72	8,71	10,91	13,93
C19 : 0	-	-	0,52	-	-
C19 : 1	-	-	-	-	-
C20 : 0	-	2,02	1,64	5,72	5,84
C20 : 1	-	-	0,28	8,24	4,39
C21 : 0	-	-	-	-	0,10
C21 : 1	-	-	-	-	-
C22 : 0	-	4,16	8,10	-	4,87
C22 : 1	-	-	-	-	-
TOTAL	99,99	99,98	99,99	99,99	99,99

TABLEAU 52 : RÉPARTITION DES ACIDES GRAS CONSTITUTIFS DES TRIGLYCOSYL-CÉRAMIDES.



Formule de Shortland	matériel	Styles vierges S ₁ S ₁	Styles autopollinisés S ₁ S ₁ x S ₁ S ₁	Styles xéнопollinisés S ₁ S ₁ x S ₂ S _h	Pollen S ₁ Allèle S ₁	Pollen Bg Allèles S ₂ ou S _h
C12 : 0		0,58	1,39	1,44	0,42	1,02
C12 : 1		0,07	0,21	0,09	0,12	0,11
C13 : 0		0,05	0,44	0,52	0,34	0,52
C13 : 1		0,34	0,51	0,24	0,30	0,22
C14 : 0		0,96	0,84	1,99	1,22	0,93
C14 : 1		0,39	0,62	0,40	0,11	0,35
C15 : 0		0,87	2,05	2,32	0,87	1,83
C15 : 1		0,23	1,44	0,54	0,10	0,58
C16 : 0		25,46	25,07	32,16	64,31	25,46
C16 : 1		3,14	7,46	4,65	3,86	9,21
C17 : 0		1,29	1,42	1,63	2,91	1,69
C17 : 1		0,72	1,19	0,63	-	1,50
C18 : 0		32,88	14,29	15,05	14,72	13,51
C18 : 1		15,01	14,59	9,50	1,79	20,64
C18 : 2		11,61	3,23	13,38	-	7,07
C18 : 3		0,59	1,20	9,63	0,44	6,11
C19 : 0		-	1,69	0,53	-	1,33
C19 : 1		-	-	-	-	-
C20 : 0		2,36	0,87	2,80	8,48	1,54
C20 : 1		2,53	0,65	1,10	-	0,51
C21 : 0		0,49	0,78	0,38	-	-
C21 : 1		-	-	-	-	-
C22 : 0		0,42	20,04	1,01	-	5,86
C22 : 1		-	-	-	-	-
TOTAL		99,99	99,98	99,99	99,99	99,99



TABLEAU 53 : RÉPARTITION DES ACIDES GRAS CONSTITUTIFS DES TRIGLYCOSYLCÉRAMES.

matériel formule de Shortland	Styles vierges S_1S_2	Styles autopollinisés $S_1S_2 \times S_1S_2$	Styles xéropollinisés** $S_1S_2 \times S_2S_4$	Pollen Bb Allèles S_1 ou S_2	Pollen Bg Allèles S_2 ou S_4
C12 : 0	0,93	4,69	0,98	1,03	1,02
C12 : 1	0,07	0,33	0,94	0,14	0,11
C13 : 0	0,23	4,00	0,87	0,05	0,52
C13 : 1	0,56	2,71	3,31	0,34	0,22
C14 : 0	6,70	1,96	1,25	0,70	0,93
C14 : 1	1,14	1,04	1,82	0,62	0,35
C15 : 0	6,35	1,96	3,99	1,36	1,83
C15 : 1	0,87	1,02	0,53	0,24	0,58
C16 : 0	29,15	29,42	16,82	34,30	25,46
C16 : 1	5,51	2,47	6,03	2,88	9,21
C17 : 0	3,04	1,37	2,38	1,49	1,69
C17 : 1	0,60	1,06	0,52	0,67	1,50
C18 : 0	21,83	17,72	7,06	31,55	13,51
C18 : 1	6,74	9,88	6,33	4,92	20,64
C18 : 2	1,58	3,69	3,26	8,26	7,07
C18 : 3	0,66	10,87	3,36	4,97	6,11
C19 : 0	1,22	2,04	2,74	-	1,33
C19 : 1	-	1,96	-	-	-
C20 : 0	5,67	-	1,25	2,96	1,54
C20 : 1	1,35	1,80	3,71	1,73	0,51
C21 : 0	1,38	-	1,08	0,60	-
C21 : 1	-	-	2,46	-	-
C21 : 2	-	-	14,23	-	-
C22 : 0	4,41	-	0,03	1,17	5,86
C22 : 1	-	-	6,13	-	-
TOTAL	99,99	99,99	99,99	99,98	

**Croisement demi-compatible

TABLEAU 54 : RÉPARTITION DES ACIDES GRAS CONSTITUTIFS DES TRIGLYCOSYL-CÉRAMIDES.



matériel formule de Shortland	Styles vierges S_2S_4	Styles autopollinisés $S_2S_4 \times S_2S_4$	Styles xéнопollinisés $S_2S_4 \times S_1S_1$	Pollen Bg Allèles S_2 ou S_4	Pollen S1 Allèle S_1
C12 : 0	1,52	1,93	0,42	1,02	0,42
C12 : 1	0,05	0,17	0,04	0,11	0,12
C13 : 0	0,68	0,71	0,28	0,52	0,34
C13 : 1	0,36	0,95	0,18	0,22	0,30
C14 : 0	1,03	2,98	1,62	0,93	1,22
C14 : 1	0,01	1,82	0,53	0,35	0,11
C15 : 0	1,49	3,06	1,54	1,83	0,87
C15 : 1	0,28	1,06	0,27	0,58	0,10
C16 : 0	23,95	37,40	42,38	25,46	64,31
C16 : 1	5,28	7,71	6,29	9,21	3,86
C17 : 0	1,63	2,24	2,21	1,69	2,91
C17 : 1	1,05	1,38	0,46	1,50	-
C18 : 0	46,44	17,10	23,72	13,51	4,72
C18 : 1	10,91	16,12	8,01	20,64	1,73
C18 : 2	2,68	3,12	4,00	7,07	-
C18 : 3	-	1,26	2,31	6,11	0,44
C19 : 0	0,94	0,99	-	1,33	-
C19 : 1	-	-	-	-	-
C20 : 0	0,97	-	3,89	1,54	8,48
C20 : 1	0,72	-	0,71	0,51	-
C21 : 0	-	-	-	-	-
C21 : 1	-	-	-	-	-
C22 : 0	-	-	1,13	5,86	-
C22 : 1	-	-	-	-	-
TOTAL	99,99	99,99	99,99	99,99	99,99

α)analyse des bases sous forme d'aldéhydes : la transformation des bases en aldéhydes est réalisée par oxydation au tétra-acétate de plomb (fiche technique n° 29). Au cours de l'oxydation, les bases trihydroxylées perdent 3 atomes de carbone, tandis que les bases dihydroxylées n'en perdent que 2. Les aldéhydes ainsi obtenus auront donc une chaîne plus courte. Les aldéhydes sont identifiés et dosés par chromatographie en phase gazeuse (colonne de DEGS à 10 % sur chromosorb W 60/80 mesh AW, fiche technique n° 29).

L'identification des aldéhydes n'est pas entièrement fiable par cette technique ; il est indispensable de la coupler à une (au moins) autre méthode analytique ; nous avons utilisé la transformation des aldéhydes en acides gras homologues.

β)analyse des bases sous forme d'acides gras : elle est réalisée par oxydation par le permanganate de potassium (fiche technique n° 29). Les acides gras ainsi obtenus sont transestérifiés par le mélange méthanol-acide sulfurique. Après purification par CCM, ils sont analysés par chromatographie en phase gazeuse sur colonne de DEGS 10 % sur chromosorb W (fiche technique n° 13).

3-analyse de la copule osidique : Elle est effectuée sur une partie aliquote de la phase méthanolique. 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 CH₃OH anhydre) pendant 24 heures à 80°C. Après trifluoroacétylation du méthanolysat, l'analyse des oses est effectuée en phase gazeuse sur colonne d'OV 210 avec programmation de température de 110 à 210°C à raison de 1°C par minute (fiche technique n° 30).

4-distribution des acides gras : La répartition des acides gras des différentes classes de GSL a été successivement analysée au niveau du pollen et des styles non pollinisés ou pollinisés (auto et xénopollinisation).

L'étude a porté sur plusieurs paramètres : mise en évidence des acides gras les plus importants (en pourcentage relatif), degré de saturation, distribution des AG à nombre impair d'atomes de carbone, longueur de la chaîne carbonée (importance relative des AG à chaîne courte (C10 à C13), moyenne (C14 à C17), en C18, à chaîne longue (C19 à C24).

Dans chaque cas, nous avons réalisé l'analyse comparative entre le pollen et le style vierge puis envisagé les modifications de la distribution des AG en fonction des 2 types de pollinisations.

TABLEAU 55 : RÉPARTITION DES ACIDES GRAS CONSTITUTIFS DES TÉTRAGLYCOSYL CÉRAMIDES.



Formule de matériel Shortland	Styles vierges $S_1 S_1$	Styles autopolymérisés $S_1 S_1 \times S_1 S_1$	Styles xéopolymérisés $S_1 S_1 \times S_2 S_1$	Pollen S_1 Allèles S_1	Pollen Bg Allèles S_2 ou S_1
C12 : 0	1,04	3,23	1,27	0,14	1,75
C12 : 1	0,07	-	0,08	1,41	-
C13 : 0	0,80	2,63	1,20	4,23	0,07
C13 : 1	0,80	1,00	1,37	1,99	0,32
C14 : 0	1,97	1,02	0,82	1,40	1,41
C14 : 1	0,69	1,18	0,46	1,16	0,49
C15 : 0	2,07	1,04	0,45	0,46	3,58
C15 : 1	0,56	0,80	1,94	0,86	1,02
C16 : 0	34,76	20,65	13,57	24,97	39,66
C16 : 1	6,55	3,46	2,17	6,11	4,44
C17 : 0	1,84	3,50	0,85	2,19	2,77
C17 : 1	1,09	3,00	0,15	0,92	0,74
C18 : 0	17,80	17,59	22,80	15,27	22,93
C18 : 1	12,46	17,43	7,48	17,77	6,90
C18 : 2	7,93	6,07	15,33	6,63	2,11
C18 : 3	2,96	6,42	6,41	4,81	1,60
C19 : 0	0,51	0,87	1,65	2,46	0,74
C19 : 1	-	-	-	-	-
C20 : 0	2,32	3,24	17,81	4,04	2,09
C20 : 1	1,15	1,79	2,89	1,14	1,11
C21 : 0	0,28	1,14	1,31	1,09	-
C21 : 1	-	-	-	0,94	-
C22 : 0	2,33	3,93	-	-	6,26
C22 : 1	-	-	-	-	-
TOTAL	99,98	99,99	99,99	99,99	99,99

TABLEAU 56 : RÉPARTITION DES ACIDES GRAS CONSTITUTIFS DES TÉTRAOLYCYCÉRAMIDES.



Formule de Shortland	matériel		Styles autopollinisés $S_1S_2 \times S_1S_2$	Styles xéнопollinisés $S_1S_2 \times S_2S_1$	Pollen Bb Allèles S_1 ou S_2	Pollen Bg Allèles S_2 ou S_1
	Styles vierges S_1S_2					
C12 : 0	1,87		0,33	0,30	0,07	1,75
C12 : 1	-		-	0,32	3,0h	-
C13 : 0	1,55		2,02	2,20	-	0,07
C13 : 1	0,25		0,87	1,45	1,91	0,32
C14 : 0	0,72		0,81	1,29	1,16	1,41
C14 : 1	0,76		0,71	4,55	1,05	0,49
C15 : 0	2,19		0,55	1,31	0,27	3,58
C15 : 1	0,28		0,18	3,92	0,20	1,02
C16 : 0	37,0h		24,70	29,78	19,77	39,66
C16 : 1	3,17		2,20	6,83	3,81	4,45
C17 : 0	2,22		1,43	1,86	2,51	2,77
C17 : 1	0,66		0,50	1,45	1,19	0,74
C18 : 0	20,33		12,10	17,17	19,31	22,93
C18 : 1	11,4h		10,6h	15,69	25,69	6,90
C18 : 2	4,40		18,10	2,31	6,63	2,11
C18 : 3	3,33		12,91	0,97	6,86	1,60
C19 : 0	1,55		1,88	2,00	-	0,74
C19 : 1	-		-	-	-	-
C20 : 0	3,22		4,35	1,38	4,37	2,09
C20 : 1	1,76		0,79	1,31	2,15	1,11
C21 : 0	-		0,88	0,71	-	-
C21 : 1	-		-	-	-	-
C22 : 0	3,25		4,0h	3,18	-	6,24
C22 : 1	-		-	-	-	-
TOTAL	99,99		99,99	99,98	99,99	99,98

:: Croisement demi-compatible

TABLEAU 57 : RÉPARTITION DES ACIDES GRAS CONSTITUTIFS DES TÉTRAGLYCOSYL-CÉRAMIDES.



formule de matériel Shortland	Styles vierges S_2S_4	Styles autopollinisés $S_2S_4 \times S_2S_4$	Styles xéнопollinisés $S_2S_4 \times S_1S_1$	Pollen Bg Allèles S_2 ou S_4	Pollen S1 Allèle S_1
C12 : 0	1,11	5,78	0,09	1,75	0,14
C12 : 1	-	-	-	-	1,41
C13 : 0	3,27	2,22	0,87	0,07	4,23
C13 : 1	1,60	0,89	0,97	0,32	1,99
C14 : 0	0,80	1,11	0,25	1,41	1,40
C14 : 1	1,00	1,19	0,37	0,49	1,16
C15 : 0	1,99	2,83	0,71	3,58	0,46
C15 : 1	0,67	0,68	1,00	1,02	0,86
C16 : 0	30,55	28,76	50,10	39,66	24,97
C16 : 1	2,60	2,75	3,09	4,41	6,11
C17 : 0	2,20	1,30	2,17	2,77	2,19
C17 : 1	0,69	0,55	0,50	0,74	0,92
C18 : 0	19,16	26,24	20,31	22,93	15,27
C18 : 1	4,12	13,95	7,30	6,90	17,77
C18 : 2	6,20	3,46	3,59	2,11	6,63
C18 : 3	4,20	1,26	2,16	1,60	4,81
C19 : 0	3,18	0,71	0,80	0,74	2,46
C19 : 1	-	-	-	-	-
C20 : 0	3,30	4,16	5,90	2,09	4,04
C20 : 1	1,83	0,43	0,63	1,11	1,14
C21 : 0	-	0,28	-	-	1,09
C21 : 1	-	-	-	-	0,94
C22 : 0	1,52	1,44	-	6,26	-
C22 : 1	-	-	-	-	-
TOTAL	99,99	99,99	99,99	99,99	99,99

a. répartition des AG dans le pollen et le style non pollinisé : elle est reportée dans les tableaux 43 à 57. La première remarque qui s'impose est la suivante : quels que soient les allèles S, il existe des analogies importantes dans la composition en acides gras des styles et du pollen, au niveau de chacune des classes de GSL : la répartition des AG dépend essentiellement du matériel biologique et non du génotype d'incompatibilité.

α) acides gras caractéristiques : l'étude comparative permet de constater, au niveau de toutes les catégories de GSL neutres étudiées, que les acides gras les plus importants pondéralement sont les acides palmitique (C16 : 0), stéarique (C18 : 0), oléique (C18 : 1), linoléique (C18 : 2) et linoléinique (C18 : 3).

Si l'acide palmitique se retrouve en proportion abondante, voire très abondante dans tous les cas, il n'en est pas de même de l'acide linoléinique caractéristique des GSL neutres du pollen (en particulier au niveau des Cer et MGCer), alors que l'acide stéarique se retrouve souvent en quantité importante dans le style non pollinisé.

β) pourcentage de saturation : l'analyse classe par classe, génotype par génotype, du degré de saturation de tous les acides gras (pair et impair) met en évidence une différence intéressante entre le pollen et le style : en règle générale, la saturation est beaucoup plus importante au niveau du style qu'au niveau du pollen (tableau 57a).

Le pourcentage moyen de saturation pour tous les GSL neutres, s'établit ainsi :

	S_1S_1	S_1S_2	S_2S_4
Pollen	55,58	53,14	52,29
Styles vierges	67,06	77,21	69,84

La saturation importante des acides gras des styles, s'observe en particulier au niveau des céramides et des monoglycosylcéramides qui sont les précurseurs métaboliques des GSL plus complexes ; la glycosylation semble donc accompagnée de déshydrogénation au niveau des acides gras dans le pollen.

γ) répartition des acides gras à nombre impair d'atomes de carbone : elle est possible en considérant les rapports suivants (tableau 57b) :

$$\frac{\% \text{ d'acides gras à nombre impair d'atomes de carbone}}{\% \text{ d'acides gras à nombre pair d'atomes de carbone}} \left(\frac{I}{P} \right)$$

TABLEAU 57A :

EVOLUTION DU DEGRE DE SATURATION DES ACIDES GRAS DES GSL DES STYLES VIERGES, POLLINISES ET DU POLLEN.

	CER			MG CER			DG CER			TG CER			TRG CER		
	S	I	I/S	S	I	I/S	S	I	I/S	S	I	I/S	S	I	I/S
<u>PLANTE S₁ (S₁S₁L)</u>															
Styles vierges	56,65	43,35	0,77	77,99	22,01	0,28	69,42	30,58	0,44	65,53	34,37	0,52	65,74	34,26	0,52
Styles autopolinisés	56,69	44,29	0,78	70,31	29,69	0,42	60,49	39,51	0,65	67,90	32,10	0,47	50,85	41,15	0,81
Styles xétopollinisés	45,52	54,58	1,20	52,61	47,39	0,90	37,13	62,87	1,69	59,84	40,16	0,67	61,72	38,28	0,62
Pollen	33,00	67,00	2,03	34,58	65,42	1,89	59,67	40,33	0,68	93,28	6,72	0,07	56,26	43,74	0,78
<u>PLANTE Bb (S₁S₂L)</u>															
Styles vierges	64,97	35,03	0,54	76,83	93,17	0,30	79,31	20,69	0,26	80,92	19,08	0,24	84,03	15,97	0,19
Styles autopolinisés	62,22	37,78	0,61	65,34	34,66	0,53	76,09	23,97	0,32	63,17	36,83	0,58	53,91	46,90	0,87
Styles xétopollinisés**	72,72	27,28	2,67	56,76	43,24	0,76	66,15	33,85	0,51	47,49	52,51	1,11	61,20	38,80	0,63
Pollen	30,15	69,85	2,32	29,23	70,77	29,42	78,55	21,45	0,28	75,23	24,77	0,33	52,53	52,53	0,90
<u>PLANTE Bg (S₂S₄L)</u>															
Styles vierges	55,40	44,60	0,81	83,35	16,65	0,20	64,72	35,28	0,55	78,66	21,34	0,27	67,09	32,91	0,49
Styles autopolinisés	60,16	39,84	0,66	67,87	32,13	0,47	65,79	34,21	0,52	66,41	33,59	0,51	70,39	29,61	0,42
Styles xétopollinisés	61,59	38,41	0,62	45,80	54,20	1,18	62,23	34,77	0,56	77,20	22,80	0,30	80,39	19,61	0,24
Pollen	34,59	65,41	1,89	35,15	64,85	1,84	56,76	43,24	0,76	53,70	46,30	0,86	81,27	18,73	0,23

*croisement demi - compatible

S = Acides gras saturés - I = Acides gras insaturés.



Globalement, pour tous les GSL neutres, on obtient les résultats suivants :

	S_1S_1	S_1S_2	S_2S_4
Pollen	0,074	0,042	0,068
Styles vierges	0,094	0,142	0,106

Le rapport $\frac{I}{P}$ est toujours inférieur dans le pollen comparé au style non pollinisé, pour chacun des géotypes étudiés.

Une analyse plus détaillée est possible en comparant les rapports :

$$\frac{\text{AG à nombre impair d'atomes de carbone, saturés}}{\text{AG à nombre pair d'atomes de carbone, saturés}} \left(\frac{IS}{PS} \right)$$

et :

$$\frac{\text{AG à nombre impair d'atomes de carbone, insaturés}}{\text{AG à nombre pair d'atomes de carbone, insaturés}} \left(\frac{II}{PI} \right)$$

On obtient les résultats suivants :

	S_1S_1	S_1S_2	S_2S_4
$\frac{IS}{PS}$ pollen	0,106	0,094	0,078
$\frac{IS}{PS}$ style	0,142	0,128	0,114
$\frac{II}{PI}$ pollen	0,054	0,046	0,054
$\frac{II}{PI}$ style	0,074	0,134	0,114

Le pourcentage d'acides gras à nombre impair d'atomes de carbone, saturés ou non, est supérieur dans le style non pollinisé. Une caractéristique du pollen est de posséder moins d'acides gras impairs insaturés que le style vierge.

L'analyse de ces différents rapports au niveau de chacune des classes de GSL permet de constater que ces considérations se retrouvent dans presque tous les cas mais sont surtout justifiées au niveau des céramides et des monoglycosylcéramides.

TABLEAU 57B :

EVOLUTION DES RAPPORTS I/P, IS/PS, I_{In}/P_{In} DES ACIDES GRAS DANS LES GLYCOSPHINGOLIPIDES NEUTRES DES STYLES VIERGES, POLLINISES ET DU POLLEN.

	CER			MGGER			DGGER			TGGER			TRGGER		
	I/P	IS/PS	I_{In}/P_{In}	I/P	IS/PS	I_{In}/P_{In}	I/P	IS/PS	I_{In}/P_{In}	I/P	IS/PS	I_{In}/P_{In}	I/P	IS/PS	I_{In}/P_{In}
<u>PLANTE S₁ (S₁S₁)</u>															
Styles vierges	0,09	0,15	0,04	0,16	0,18	0,10	0,08	0,19	0,01	0,04	0,09	0,02	0,10	0,10	0,10
Styles autopolinisés	0,14	0,12	0,16	0,11	0,14	0,05	0,06	0,07	0,55	0,11	0,15	0,11	0,16	0,18	0,13
Styles xétopollinisés	0,07	0,12	0,04	0,07	0,12	0,02	0,03	0,06	0,01	0,07	0,10	0,04	0,10	0,10	0,19
Pollen S ₁	0,04	0,09	0,02	0,05	0,11	0,02	0,06	0,05	0,08	0,05	0,05	0,06	0,17	0,23	0,09
<u>PLANTE Bb (S₁S₂)</u>															
Styles vierges	0,19	0,10	0,12	0,12	0,14	0,15	0,13	0,11	0,23	0,17	0,18	0,12	0,10	0,11	0,05
Styles autopolinisés	0,25	0,22	0,31	0,09	0,11	0,07	0,08	0,05	0,16	0,19	0,17	0,22	0,09	0,15	0,03
Styles xétopollinisés**	0,02	0,30	0,03	0,10	0,09	0,11	0,17	0,23	0,08	0,18	0,30	0,15	0,18	0,15	0,21
Pollen	0,04	0,09	0,02	0,03	0,05	0,02	0,03	0,02	0,07	0,05	0,05	0,05	0,06	0,06	0,07
<u>PLANTE Bg (S₂S₁)</u>															
Styles vierges	0,07	0,10	0,11	0,15	0,14	0,18	0,08	0,08	0,09	0,07	0,06	0,09	0,16	0,19	0,10
Styles autopolinisés	0,15	0,19	0,10	0,11	0,13	0,05	0,06	0,07	0,11	0,12	0,12	0,11	0,10	0,11	0,09
Styles xétopollinisés	0,07	0,10	0,02	0,07	0,08	0,05	0,08	0,08	0,08	0,05	0,06	0,04	0,08	0,06	0,15
Pollen	0,03	0,05	0,01	0,06	0,09	0,02	0,07	0,06	0,07	0,08	0,09	0,05	0,10	0,10	0,12

*croisement demi-compatible

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

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

S : acides gras saturés

In : acides gras insaturés.

δ) longueur de la chaîne carbonée : l'étude de la longueur de la chaîne carbonée permet également de différencier pollen et style vierge :

	S_1S_1	S_1S_2	S_2S_4

C10-C13			
pollen	2,97	1,65	1,59
style	1,64	4,73	3,06
C14-C17			
pollen	40,03	34,29	38,74
style	42,70	42,83	45,54
C18			
pollen	45,94	53,97	49,73
style	47,62	37,14	43,36
C19-C22			
pollen	11,19	6,78	9,96
style	7,99	9,95	5,91

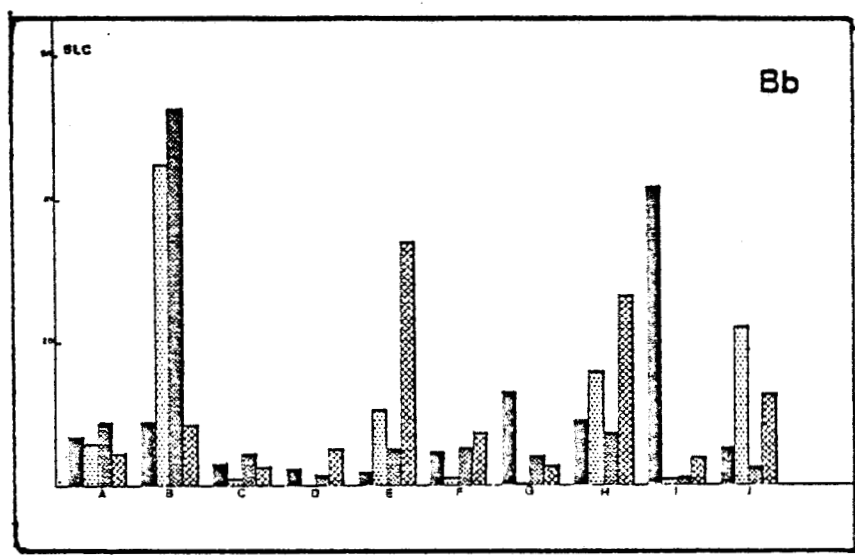
Les pourcentages globaux ne sont pas significatifs, mais l'analyse classe par classe de la longueur de la chaîne carbonée des AG met en évidence que les styles sont caractérisés par des acides gras "moyens" et en C18 alors que les pollens possèdent en général une chaîne carbonée plus longue et sont relativement plus riches en C18. La différence est surtout marquée au niveau des céramides et des monoglycosylcéramides ; les acides gras des di et triglycosylcéramides caractérisent moins le pollen ou le style.

En conclusion, la distribution des acides gras des GSL des pollens et des styles non pollinisés ne semble pas dépendre du génotype d'incompatibilité mais est caractéristique d'un type de matériel ; les différences entre pollen et style sont plus accentuées au niveau des céramides et des monoglycosylcéramides ; pour ces deux classes de GSL, on distingue une distribution d'acides gras de type "stylaire" caractérisée par l'abondance des acides palmitique et stéarique, par un degré de saturation relativement élevé, par une forte teneur en acides gras à nombre impair d'atomes de carbone et enfin par une chaîne carbonée généralement moins longue que dans les pollens ; ceux-ci, outre les caractéristiques précédentes inverses de celles du style, possèdent essentiellement les acides palmitique et linoléique.

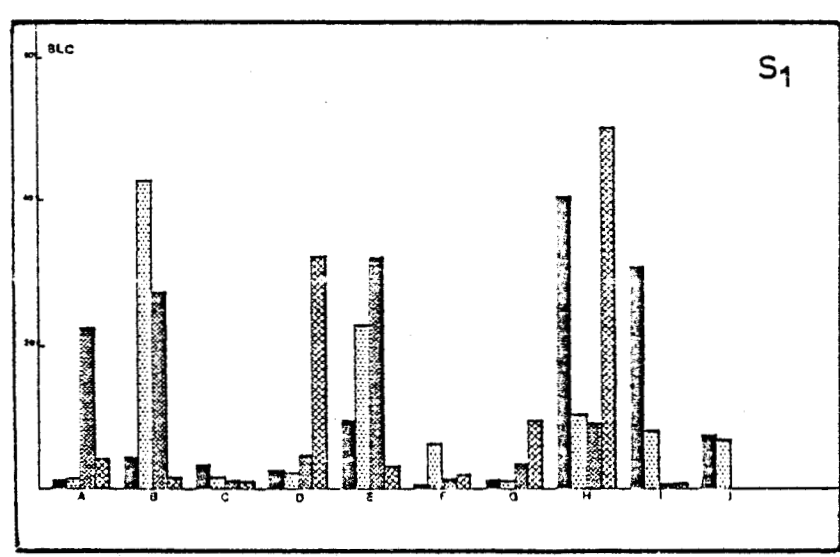
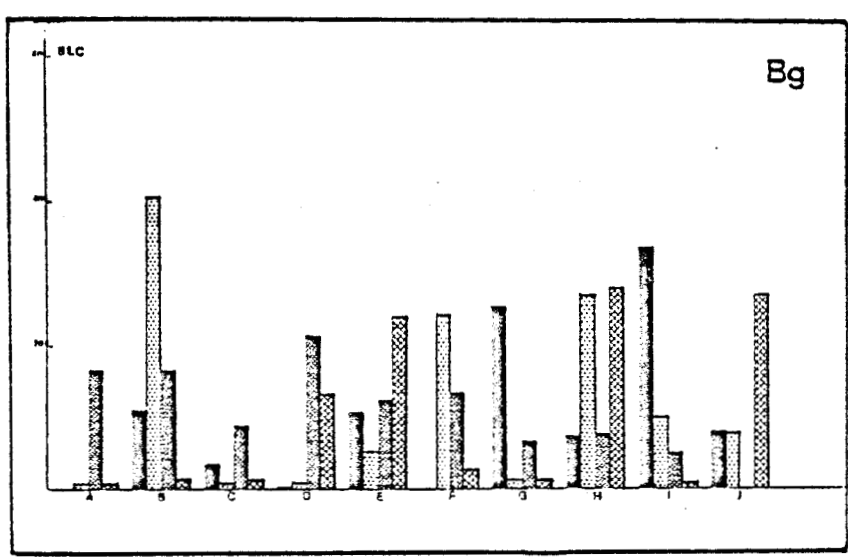
Pour les autres classes de GSL, les différences sont moins évidentes ; cependant, les styles sont en général plus saturés et comportent des acides gras à nombre impair d'atomes de carbone en quantité supérieure.

TABLEAU 58 : DISTRIBUTION DES BASES À LONGUE CHAÎNE DANS LES CÉRAMIDES.

- A : d16:0, t17:0
- B : d17:0, t18:0
- C : d16:1
- D : d18:0, t19:0
- E : d17:1, t18:1
- F : d19:0, t20:0
- G : d18:1
- H : d20:0
- I : d19:1
- J : ?
- K : d18:2, ?
- L : d20:1, ?



- pollen
- style vierge
- style autopollinisé
- style xéнопollinisé



b. évolution au cours de la pollinisation : à partir des résultats précédents, il est intéressant de comparer la composition des acides gras des GSL des styles qui ont subi la pollinisation, soit compatible, soit incompatible et de la comparer avec la répartition initiale dans le style vierge.

Dans le cas de l'autopollinisation, on constate des différences notables surtout au niveau des céramides et des monoglycosylcéramides ; pour tous les génotypes envisagés, l'évolution se réalise dans le même sens : les acides gras majeurs sont les acides palmitique, stéarique et linoléique ; le degré de saturation est relativement élevé, comparable à celui des styles non pollinisés ; de même que la teneur en acides gras à nombre impair d'atomes de carbone ; par contre, il faut noter l'apparition en quantité importante d'acides gras à longue chaîne carbonée.

Pour les GSL plus complexes, les différences sont moins évidentes et les génotypes envisagés n'évoluent pas tous dans le même sens ; on peut cependant remarquer un fort pourcentage d'acides gras impairs insaturés pour les diglycosylcéramides et un pourcentage de saturation qui faiblit au niveau des tétraglycosylcéramides.





La comparaison avec la répartition dans les styles vierges met en évidence l'apparition d'acides gras majeurs caractéristiques comme l'acide linoléique et l'apparition d'AG longs : le métabolisme des AG semble donc intermédiaire entre le type pollinique et le type stylaire.

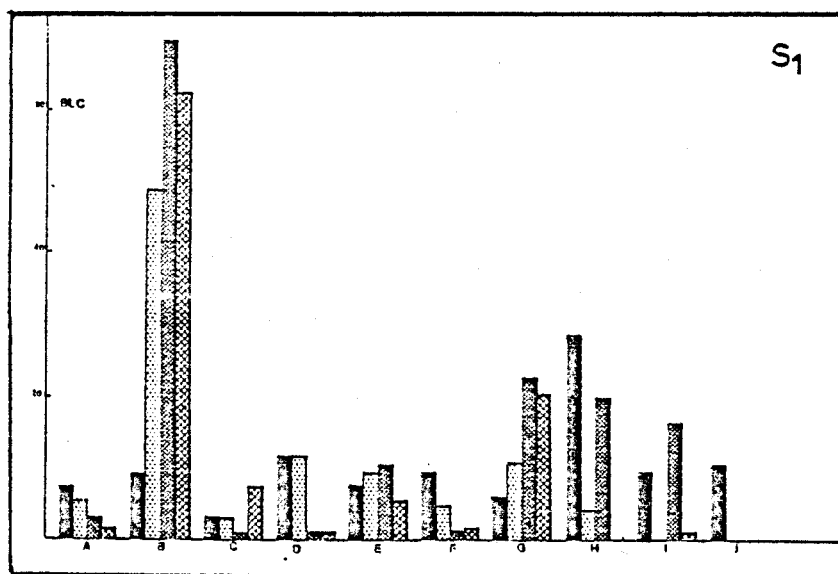
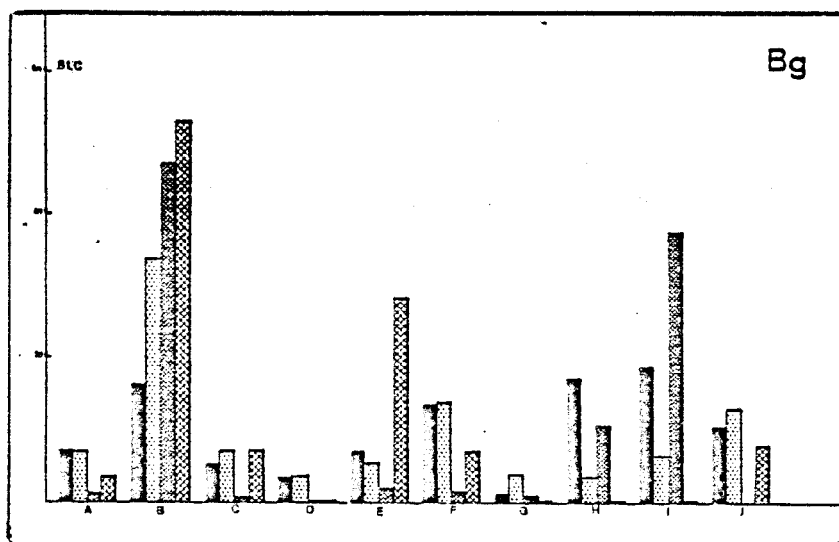
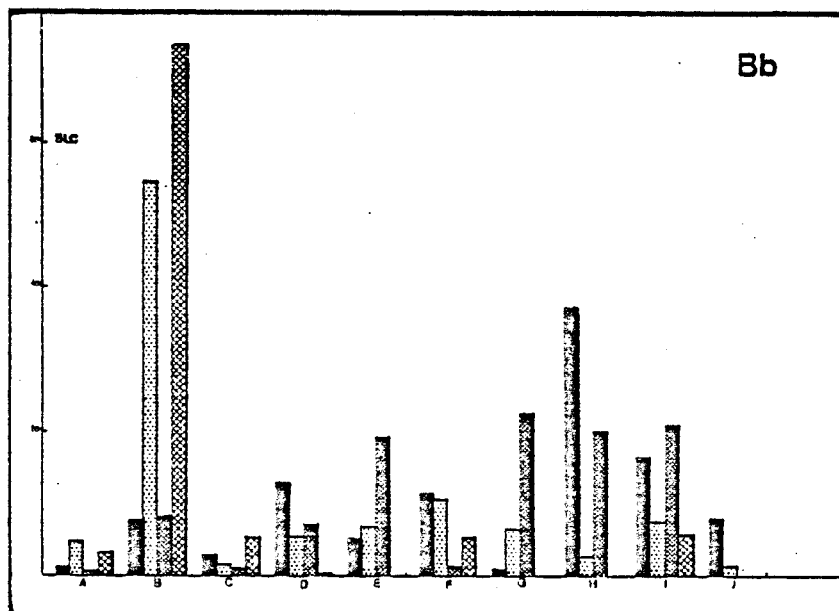
Dans le cas de la xénopollinisation, il faut distinguer le croisement compatible ($S_1 \times Bg$ et $Bg \times S_1$) du croisement demi compatible ($Bb \times Bg$). Dans le cas du croisement compatible, les différences essentielles sont situées au niveau des céramides et des monoglycosylcéramides. La xénopollinisation compatible induit essentiellement l'augmentation, dans ces deux classes de GSL, du pourcentage relatif d'AG à chaîne courte de façon concomitante à la disparition d'acides gras à longue chaîne. Le degré de saturation évolue de façon contradictoire mais il apparaît une proportion élevée d'acide linoléique. Pour les autres catégories de GSL, les variations, là encore, ne sont pas simples à analyser.

Dans le cas demi compatible, se retrouvent des caractéristiques intermédiaires entre la situation incompatible et compatible : fort pourcentage de saturation (comme en autopollinisation) mais apparition d'acides gras à chaîne courte (analogue à la xénopollinisation) pour les céramides et les monoglycosylcéramides.

TABLEAU 59 : DISTRIBUTION DES BASES À LONGUE CHAÎNE DANS LES MONOGLYCOSYLCÉRAMES.

A : d16:0, t17:0
 B : d17:0, t18:0
 C : d16:1
 D : d18:0, t19:0
 E : d17:1, t18:1
 F : d19:0, t20:0
 G : d18:1
 H : d20:0
 I : d19:1
 J : ?
 K : d18:2, ?
 L : d10:1, ?

 pollen
 style vierge
 style autopollinisé
 style xéнопollinisé



5-distribution des bases à longue chaîne :

a.étude analytique de la répartition des bases à longue chaîne des styles non pollinisés : elle est réalisée de deux façons : dans un premier temps, la distribution des bases sera examinée dans toutes les classes des GSL neutres puis la répartition des BLC sera analysée en fonction du paramètre "génotype" dans chacune des classes.

L'examen des diagrammes 58 à 62 met en évidence, pour toutes les classes de GSL à l'exception des tétraglycosylcéramides, une teneur élevée en heptadéca sphinganine dans chaque génotype. Cette base peut représenter plus de 50 % du total. De façon concomitante, on enregistre un taux relativement très faible de bases à nombre élevé d'atomes de carbone (supérieur à C15) avec une seule exception : les tétraglycosylcéramides de génotype Bb (S_1S_2) où la nonadéca sphinganine est abondante. D'autre part, l'étude du pourcentage de saturation permet de souligner que, dans tous les cas, le degré de saturation est très élevé pour toutes les classes de BLC des styles non pollinisés.

L'analyse de la répartition des bases examinée en relation avec le génotype d'incompatibilité, dans chacune des classes, n'apporte pas de renseignement significatif : les variations des pourcentages relatifs pour une même base et une même classe de GSL peuvent être très élevées entre les 3 génotypes ; il n'y a donc pas de relation directe entre les allèles S et la présence d'un type de BLC.

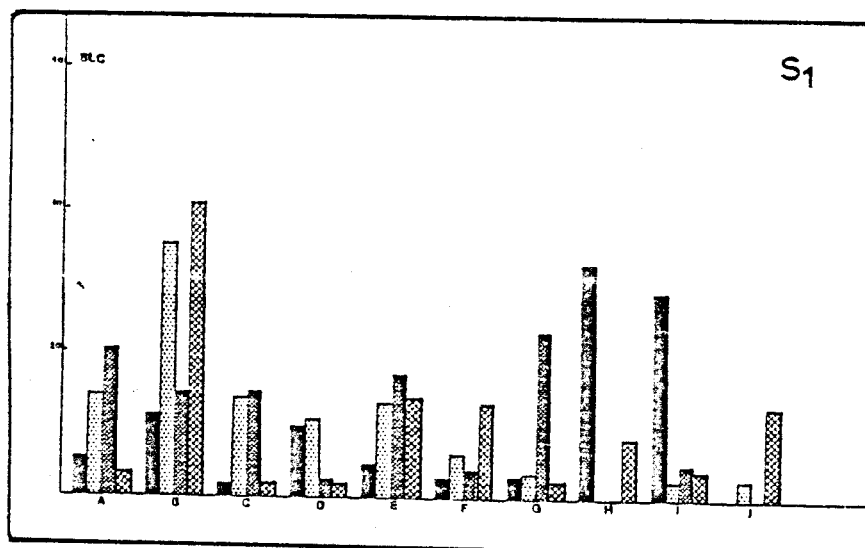
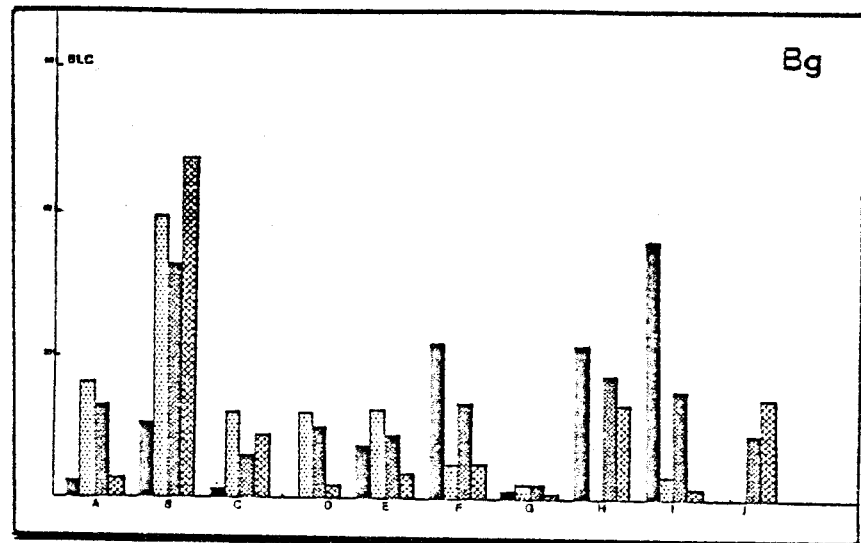
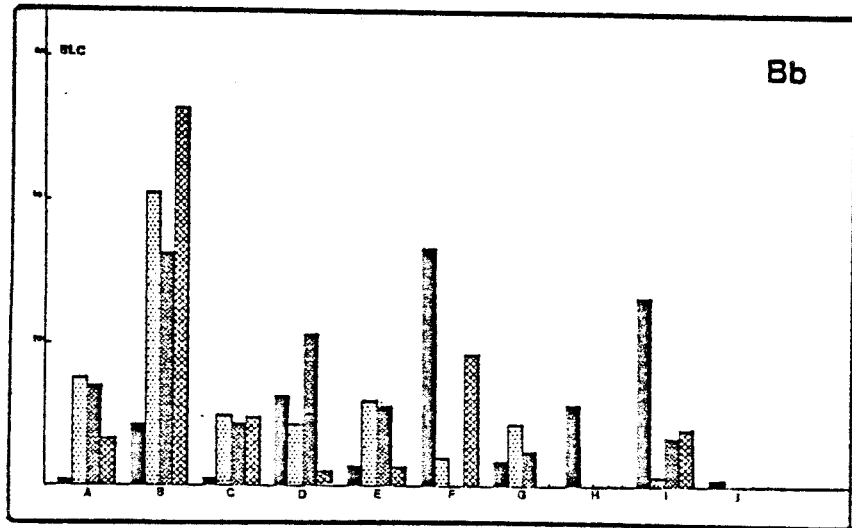
b.répartition des bases au niveau des GSL des pollens : une étude analogue pour les pollens met en évidence les caractéristiques suivantes :

- teneur toujours élevée en eicosasphinganine et en nonadéca sphingénine dans tous les cas envisagés (excepté un faible taux d'eicosasphinganine dans les tétraglycosylcéramides). Inversement, il y a très peu de bases à nombre d'atomes de carbone peu élevé ;
- l'analyse comparée des pourcentages de saturation conduit à des conclusions plus nuancées que pour les styles non pollinisés : les bases insaturées peuvent représenter, dans certains cas, jusqu'à 81 % de l'ensemble (céramides du pollen S_2S_4) ou, a contrario, être minoritaires (30 % dans les MGCer du pollen Bb) ; cependant, généralement, la teneur en bases non saturées est plus importante dans le pollen que dans le style vierge ;
- la comparaison des BLC au niveau de chacune des classes de GSL, en relation avec le génotype, ne permet pas comme dans le cas du style non pollinisé, de tirer de conclusion sur une éventuelle relation : génotype d'incompatibilité/ répartition des BLC.

Une autre manière d'appréhender le rôle éventuel des bases est d'étudier leur répartition dans le style vierge et dans celui ayant subi la pollinisation compatible ou incompatible : pour faciliter l'analyse comparative, nous avons réalisé cette étude classe de GSL par classe de GSL pour chacun des génotypes.

TABLEAU 60 : DISTRIBUTION DES BASES À LONGUE CHAÎNE DANS LES DIGLYCOSYLCÉRAMES.

A : d16:0, t17:0
 B : d17:0, t18:0
 C : d16:1
 D : d18:0, t19:0
 E : d17:1, t18:1
 F : d19:0, t20:0
 G : d18:1
 H : d20:0
 I : d19:1
 J : ?
 K : d18:2, ?
 L : d20:1, ?



pollen
 style vierge
 style autopollinisé
 style xéнопollinisé

BUS
 LILLE

c. bases à longue chaîne et céramides : au niveau des céramides, le tableau 58 met en évidence des différences très importantes entre les styles vierges et le pollen : la teneur en heptadécasphinganine est toujours supérieure à 40 % pour les styles S_1S_1 , S_1S_2 et S_2S_4 . De plus, il faut noter la présence d'un pourcentage relativement élevé d'heptadécasphingénine dans le style S_1 , de nonadécasphinganine et d'eicosasphinganine dans le style Bg et d'eicosasphingénine pour les styles non pollinisés de génotype S_1S_2 (Bb).

Dans le cas des pollens, si, seul l'allèle S_1 présente 40 % d'eicosasphinganine, tous renferment une quantité abondante de nonadécasphingénine.

La répartition des bases dans les styles ayant subi la pollinisation est très différente en situation compatible et incompatible. Dans ce dernier cas, les céramides contiennent une forte teneur en heptadécasphinganine et, généralement une proportion élevée de bases à nombre faible d'atomes de carbone. Le schéma inverse semble caractériser le croisement compatible, c'est à dire, une faible teneur en bases à chaîne carbonée relativement courte et un taux relativement fort de bases "moyennes" et "longues" (en particulier l'eicosasphinganine).

La comparaison avec la répartition constatée dans les styles vierges et les pollens montre que la xénopollinisation induit un métabolisme de type pollinique alors que la situation incompatible semble caractérisée par une répartition des bases se rapprochant du spectre observé dans les styles non pollinisés. L'analyse comparative des pourcentages de saturation ne met pas en évidence de différences significatives entre les 2 types de pollinisation.

d. bases à longue chaîne et monoglycosylcéramides : la répartition des bases dans les monoglycosylcéramides confirme les résultats obtenus pour les céramides : BLC "courtes" (surtout l'heptadécasphinganine) au niveau des styles vierges et inversement, dans le pollen, il y a abondance relative de BLC "longues" en particulier l'eicosasphinganine (tableau 59).

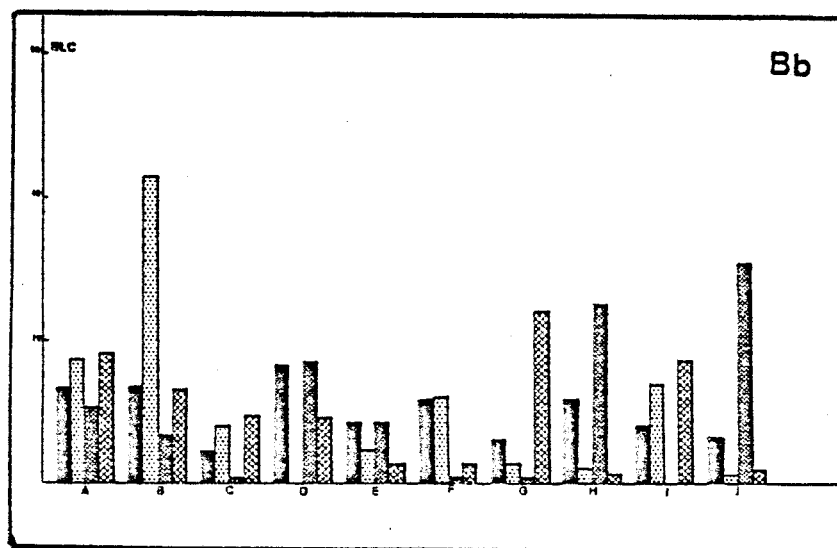
Après pollinisation compatible, la teneur en heptadécasphinganine est remarquablement élevée pour tous les génotypes (jusqu'à 70 % du total) par contre, les bases "longues" disparaissent presque complètement.





L'autopollinisation induit par contre, un taux important d'heptadécasphinganine pour les génotypes S_1 et Bg ainsi que de fortes teneurs en nonadécasphingénine.

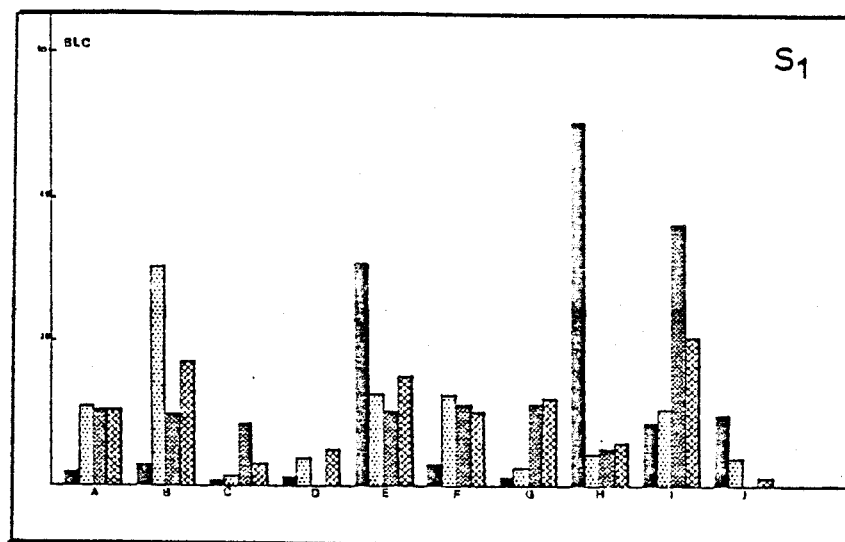
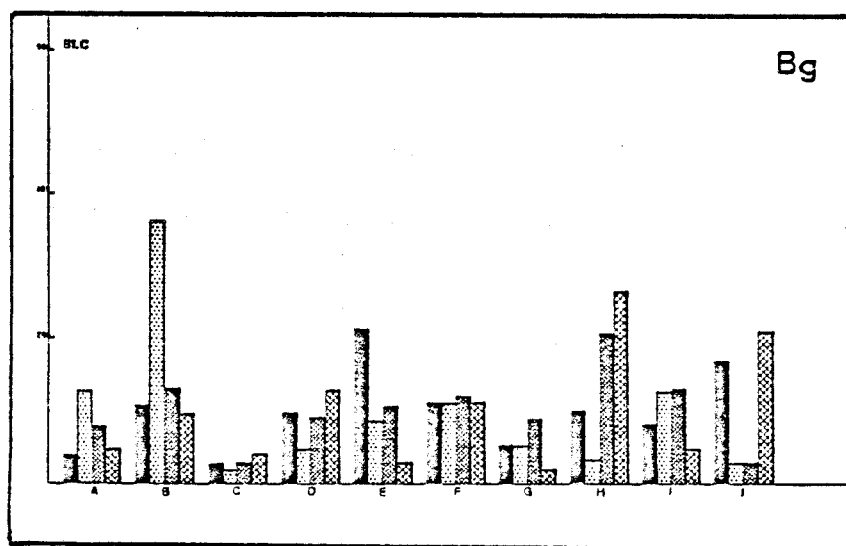
La différenciation d'un comportement de type pollinique ou stylaire en relation avec la pollinisation est moins apparente chez les

TABLEAU 61 : DISTRIBUTION DES BASES À LONGUE CHAÎNE DANS LES TRIGLYCOSYL CÉRAMIDES.

A : d16:0, t17:0
 B : d17:0, t18:0
 C : d16:1
 D : d18:0, t19:0
 E : d17:1, t18:1
 F : d19:0, t20:0
 G : d18:1
 H : d20:0
 I : d19:1
 J : ?
 K : d18:2, ?
 L : d20:1, ?



 pollen
 style vierge
 style autopollinisé
 style xénopollinisé



BUS
LILLE

monoglycosylcéramides que dans les céramides pour ce qui concerne la longueur de la chaîne carbonée des bases. Par contre, l'étude du pourcentage de saturation met en évidence une saturation plus élevée dans les styles vierges que dans les BLC des pollens correspondants. De plus, la xénopollinisation provoque une saturation des bases qui s'apparente à celle observée au niveau du pollen.

e. bases à longue chaîne et diglycosylcéramides (tableau 60) :

les résultats obtenus dans les 2 cas précédents se confirment. On observe le même type de répartition dans les styles vierges et les pollens : les BLC des diglycosylcéramides des pollens sont surtout l'eicosasphinganine et la nonadéca-sphingénine tandis qu'il existe un pourcentage important d'heptadéca-sphinganine dans le style vierge.

La xénopollinisation se traduit dans la répartition de bases par une teneur élevée en heptadéca-sphinganine tandis que l'autopollinisation est liée, au niveau des diglycosylcéramides, à une répartition homogène des BLC, ne privilégiant pas une classe particulière.

Le "spectre" des bases observé après xénopollinisation s'apparente à celui des styles non pollinisés.

Les bases du pollen sont un peu moins saturées que celles des styles ; la xénopollinisation induit une élévation de pourcentage de saturation.

f. bases à longue chaîne et triglycosylcéramides (tableau 61) :

la répartition est également caractéristique du pollen (richesse relative en eicosasphinganine) et du style non pollinisé (proportion élevée d'heptadéca-sphinganine).

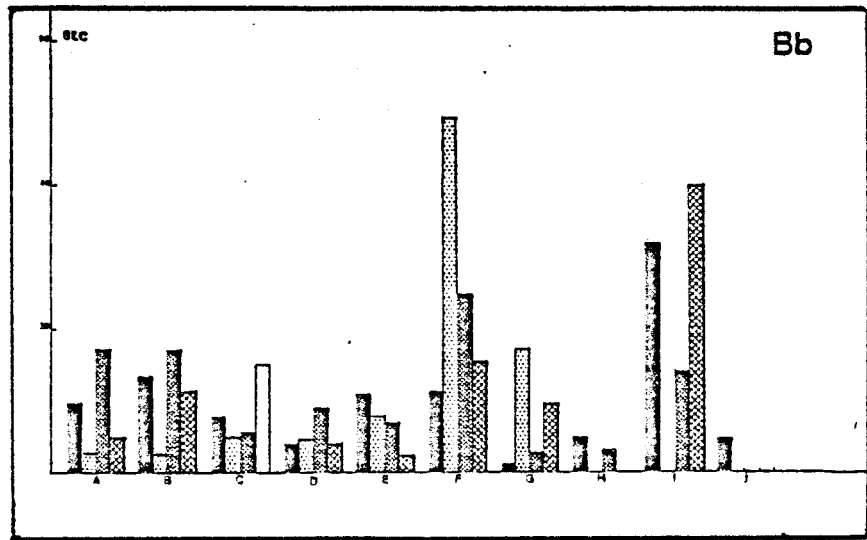
L'autopollinisation comme la xénopollinisation provoquent un bouleversement dans la répartition des bases se traduisant par une distribution régulière dans toutes les catégories de BLC avec, cependant, une plus forte proportion de bases "longues". Le degré de saturation est plus élevé dans le style vierge que dans le pollen ; la xénopollinisation est en relation avec une diminution sensible de la saturation.





g. bases à longue chaîne et tétraglycosylcéramides (tableau 62) :

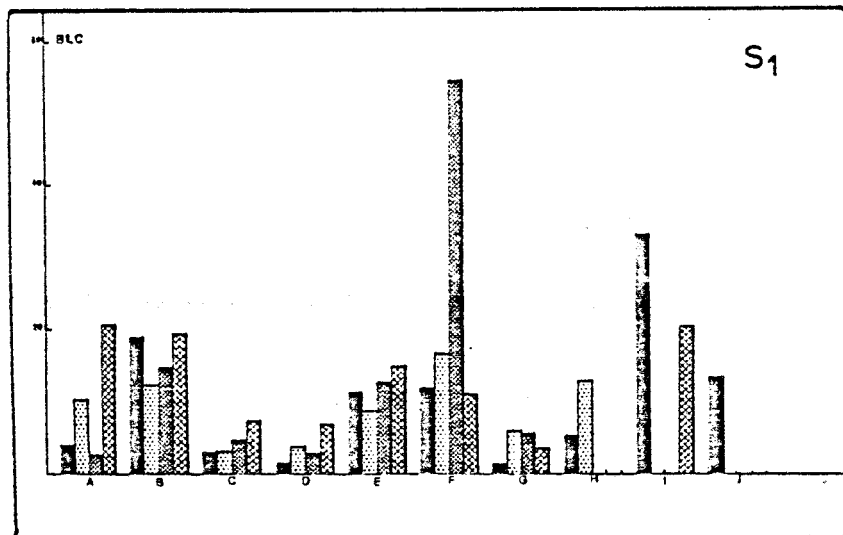
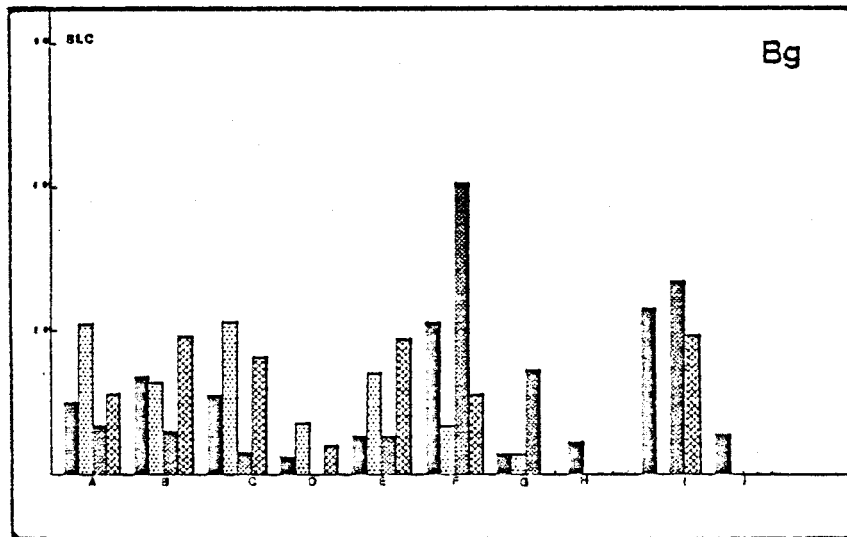
dans les tétraglycosylcéramides, la distribution des BLC est très différente, dans les pollens et les styles non pollinisés, de la répartition observée dans les autres classes de GSL : dans les deux cas, on retrouve une faible proportion de BLC à chaîne carbonée relativement courte et un taux plus élevé de BLC "longues". Dans le pollen, la base majeure pour les 3 géotypes est la nonadéca-sphingénine ; dans les styles non pollinisés, toutes les bases sont

TABLEAU 62 : DISTRIBUTION DES BASES À LONGUE CHAÎNE DANS LES TÉTRAGLYCOSYLCÉRAMES.

- A : d16:0, t17:0
- B : d17:0, t18:0
- C : d16:1
- D : d18:0, t19:0
- E : d17:1, t18:1
- F : d19:0, t20:0
- G : d18:1
- H : d20:0
- I : d19:1
- J : ?
- K : d18:2, ?
- L : d20:1, ?



-  pollen
-  style vierge
-  style autopollinisé
-  style xénopollinisé



réparties également dans les diverses classes ; il faut citer cependant un taux de 50 % de nonadécasphinganine dans le style S_1S_2 .

La xénopollinisation ne se traduit pas par un bouleversement important dans la répartition des bases ; par contre, l'autopollinisation induit un fort pourcentage de nonadécasphinganine.

6-analyse de la copule osidique : L'identification des oses liés aux GSL neutres est effectuée, pour les mono, di, tri et tétraglycosylcéramides à partir d'une fraction aliquote de la phase méthanolique provenant de l'hydrolyse.

a.extraction et identification des constituants de la copule osidique : la technique utilisée est exposée en détail fiche n° 30 ; la fraction contenant les oses est évaporée à sec sous atmosphère d'azote ; le mésoinositol (témoin interne permettant l'identification en chromatographie en phase gazeuse) est ajouté.

L'extrait subit une méthanolyse en tubes scellés pendant 24 heures à 80°C ; après dessiccation du méthanolysat sous azote à 50°C, le résidu subit une trifluoroacétylation par le mélange : dichlorométhane - anhydride trifluoroacétique pendant 5 minutes à 150°C (l'opération est répétée deux fois).

Les oses trifluoroacétylés sont soumis à une chromatographie en phase gazeuse dans un appareil Varian aérograph 2100 muni d'un détecteur à ionisation de flamme sur une colonne de verre OV 210 à 5 % et une programmation de température de 110 à 220°C à raison de 1°C/mn (débit du gaz vecteur (azote) : 7,5 ml/mn).

La technique de triméthylsilylation des oses a également été envisagée mais n'a pas été retenue, pour des raisons pratiques, bien qu'elle présente une fiabilité analogue à la trifluoroacétylation.

b.résultats des analyses : contrairement à ce qui a été trouvé chez *Petunia hybrida*, au niveau desquels 4 oses différents (rhamnose, arabinose, glucose, mannose) ont été mis en évidence, chez *Oenothera missouriensis*, tous les GSL neutres simples ou complexes (avec un ou plusieurs résidus) présentent la même caractéristique : ils ne contiennent qu'un seul type d'ose : le glucose que ce soit dans le pollen ou le style vierge, autopollinisé ou xénopollinisé.

c.conclusion : les variations qui affectent les classes de GSL du pollen ou du style en cours de pollinisation ne concernent pas la nature des oses liés ; seul, le nombre de résidus glucose varie en relation avec la réaction d'autoincompatibilité de fécondation. Il reste à déterminer si les

TABLEAU 63 : EVOLUTION DES SULFATIDES AU COURS DE LA POLLINISATION

		OENOTHERA MISSOURIENSIS								
Expression des résultats	1) nmoles/g tissu**			2) taux relatifs/ styles vierges			3) taux relatifs/ xéнопollinisation			
	S_1S_1	S_1S_2	S_2S_4	S_1S_1	S_1S_2	S_2S_4	S_1S_1	S_1S_2	S_2S_4	
Génotypes										
Styles vierges	1,3	3	1,5	1	1	1				
Pollen	34	27	22	26	9	21				
Autopollinisation	2,6	5	6				1,3	2,5	3	
Xéнопollinisation	2,0	2	2				1	1	1	

** g de tissu frais.



variations observées sont liées à l'inhibition ou à la diminution des processus de synthèse ou si, au contraire, elles seraient dûes à l'intervention d'un catabolisme actif que l'on pourrait relier aux besoins énergétiques du phénomène de rejet.

h) Analyse des sulfatides.

1-isolement des sulfolipides : Le protocole général de l'extraction des GSL présentant un caractère acide est identique à celui des GSL neutres (fiches techniques n° 21, 22 et 23). La chromatographie sur DEAE cellulose permet de séparer les constituants neutres dont l'identification et l'analyse structurale ont été effectuées, des sulfolipides que l'on retrouve dans la fraction E (tableau 37) éluée par CHCl_3 contenant 5 % de LiCl.

Une dialyse de 4 jours à 4°C dans de l'eau distillée permet l'élimination du LiCl et l'obtention des sulfatides, purifiés par chromatographie en couche mince dans le solvant : $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}/\text{H}_2\text{O}$ (65 : 25 : 4, v/v/v).

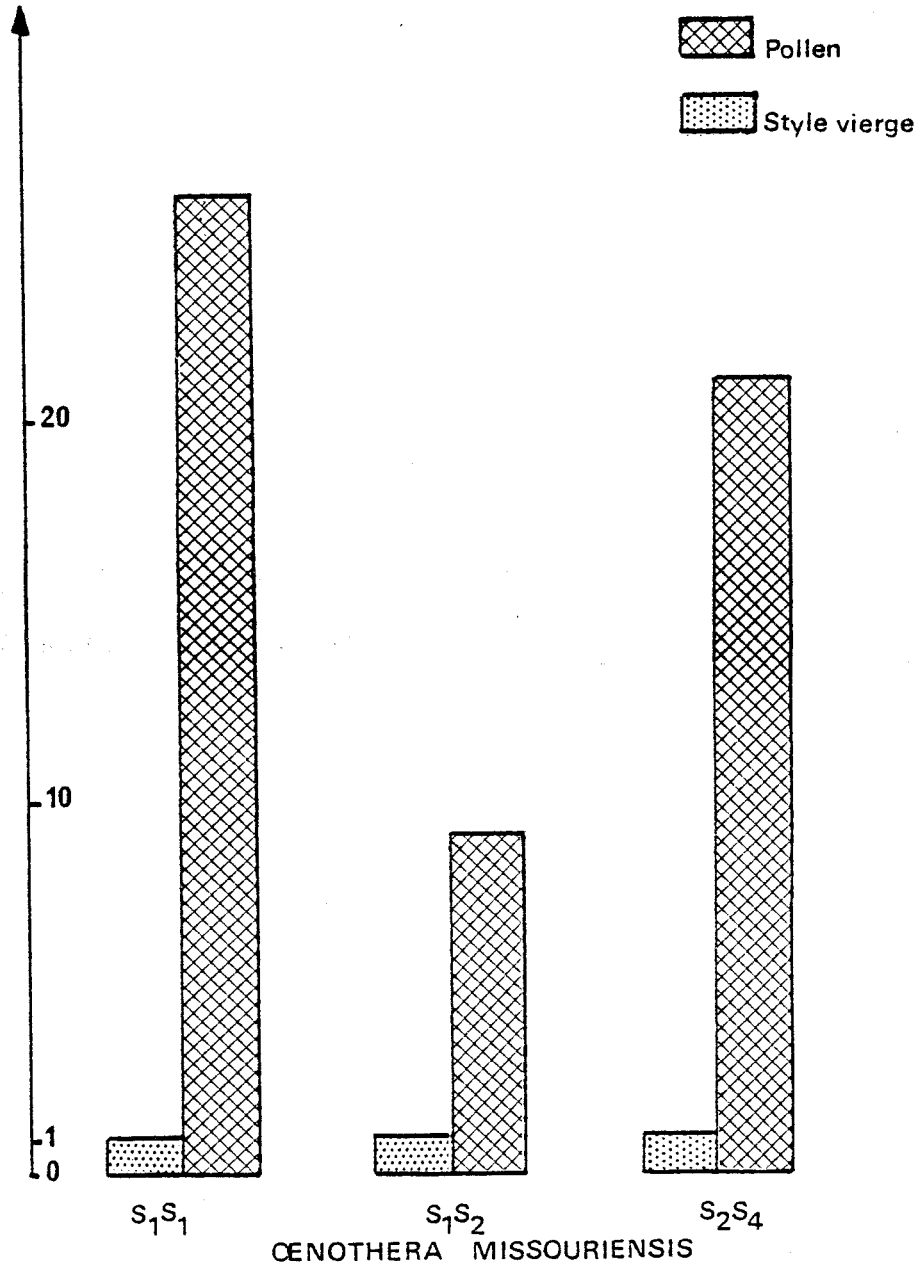
2-dosage des sulfatides : La technique utilisée est celle préconisée par NAOI (1974) (fiche technique n° 26) qui sert également pour le dosage des GSL neutres ; l'hydrolyse des sulfatides libère les bases à longue chaîne qui se combinent sélectivement avec un dérivé fluorescent : la mesure de l'intensité de la fluorescence (longueur d'onde d'excitation 385 nm, longueur d'onde d'émission 480 nm) permet d'apprécier la teneur en sulfatides.

3-résultats expérimentaux : Ils sont reportés dans les tableaux 63, 64 et 65.

a. sulfatides des pollens et des styles vierges : le tableau 63 présente les résultats des teneurs en sulfatides exprimées en nanomoles par gramme de tissu. Les valeurs trouvées se visualisent de façon plus significative à partir des taux relatifs par rapport aux styles vierges dont la teneur est arbitrairement fixée à 1 (tableau 64). Ce diagramme met en relief le fait suivant : les teneurs en sulfolipides du pollen sont plus élevées que celles des styles vierges du clone correspondant. Ainsi, dans le génotype S_1S_1 , la teneur en sulfatides des pollens représente jusqu'à 26 fois celle du style. Cette disproportion est retrouvée pour chaque génotype.

b. évolution du taux des sulfatides après pollinisation : si on envisage le rapport auto/xénopollinisation, le diagramme (tableau 65) construit selon le même principe que le tableau 64 permet de dégager les conclusions suivantes : pour *Oenothera missouriensis*, la teneur en sulfatides des styles

TABLEAU 64 :
SULFATIDES DU POLLEN
TAUX RELATIFS/STYLES VIERGES



après autopollinisation est bien supérieure à celle observée après xéнопollinisation. Ces résultats vont tous dans le même sens, quel que soit le génotype envisagé.

4-analyse des constituants des sulfatides : L'identification des constituants des sulfatides s'effectue après hydrolyse acide ; celle-ci libère les acides gras et les bases à longue chaîne de la même façon que pour les GSL neutres (fiche technique n° 27).

a. extraction et analyse des acides gras : l'hydrolysate est soumis à une extraction à l'hexane et transestérifié par le mélange méthanol-acide sulfurique. Une purification est ensuite réalisée par chromatographie en couche mince sur gel de silice G, dans le benzène (fiche technique n° 18).

Après élution, les esters méthyliques d'acides gras sont repris dans le sulfure de carbone et chromatographiés à l'état gazeux (fiche technique n° 13).

b. extraction des bases à longue chaîne et identification : les bases à longue chaîne sont extraites sélectivement par le diéthyl-éther en milieu alcalin ; elles sont ensuite transformées en DNP-dérivés stables selon le protocole de KARLSSON (1970) puis purifiées par chromatographie en couche mince (fiche technique n° 29). L'identification des bases s'effectue soit sous forme aldéhyde après oxydation par le tétracétate de plomb soit à l'état d'acides gras après oxydation par le permanganate de potassium.

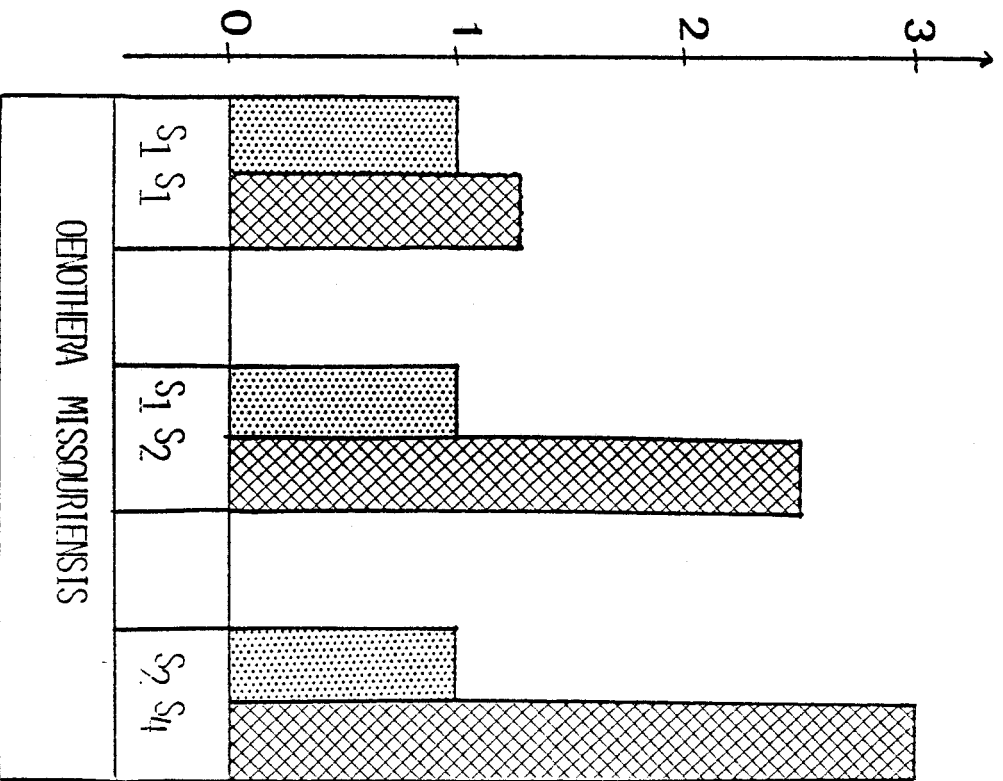
c. distribution des acides gras (tableau 66) : la répartition des acides gras constitutifs des sulfatides a été analysée au niveau du pollen et des pistils pollinisés ou non des 3 clones S₁, Bb et Bg. L'étude a porté sur la mise en évidence d'acides gras caractéristiques, le degré de saturation et la longueur de la chaîne carbonée (importance relative des acides gras à chaîne courte C10-C13, moyenne C14 à C17, en C18, à longue chaîne (C19 à C24) ainsi que sur la proportion relative d'acides gras à nombre impair d'atomes de carbone.



d. répartition des acides gras dans le pollen et le style vierge (tableau 66) :

α) acides gras caractéristiques : les acides gras majeurs dans les sulfolipides du pollen et du style sont identiques : acide palmitique (C16 : 0), stéarique (C18 : 0) et oléique (C18 : 1). Cependant, l'acide oléique (C18 : 1) est de façon générale plus abondant dans le pollen que dans le style. Contrairement aux résultats trouvés chez les GSL neutres, le pollen est peu pourvu en acide linoléique.

TABEAU 65 :

SULFATIDES AU COURS DE LA POLLINISATION
 TAUX RELATIFS/STYLES AUTOPOLLINISÉS



 AUTOPOLLINISATION
 XENOPOLLINISATION



β) pourcentages de saturation : ils s'établissent ainsi :

génotype	S ₁ S ₁	S ₁ S ₂	S ₂ S ₄
Pollen	73,50	75,08	68,96
Styles vierges	88,05	84,96	79,62

La lecture des résultats met en évidence une saturation beaucoup plus importante des acides gras des sulfatides des styles non pollinisés. Les valeurs calculées pour la saturation des GSL neutres des styles vierges présentent un profil analogue, à savoir, un plus faible degré de saturation du pollen.

γ) répartition des acides gras à nombre impair d'atomes de carbone : l'établissement du rapport

$$\frac{I}{P} = \frac{\% \text{ des AG à nombre impair}}{\% \text{ des AG à nombre pair}}$$

donne les chiffres suivants :

	pollen S ₁	pollen Bb	pollen Bg	style S ₁	style Bb	style Bg
I/P	0,07	0,05	0,05	0,09	0,11	0,12

Le rapport I/P est toujours inférieur pour le pollen lorsqu'on le compare à celui du style non pollinisé, pour chacun des clones. La proportion relative d'acides gras à nombre impair d'atomes de carbone est donc supérieure dans le style vierge.

La remarquable convergence de ces résultats avec ceux obtenus pour les acides gras des GSL neutres plaide en faveur d'une synergie des métabolismes.

L'étude du rapport IS/PS (impair saturé/pair saturé) donne les valeurs suivantes :

	Pollen			Styles		
	S ₁	Bb	Bg	S ₁	Bb	Bg
IS/PS	0,09	0,07	0,07	0,13	0,11	0,16

Quel que soit le génotype d'incompatibilité, dans le style non pollinisé, le pourcentage d'acides gras saturés à nombre impair d'atomes de carbone est supérieur à celui du pollen.

δ) longueur de la chaîne carbonée : si l'on regroupe les acides gras en fonction de la longueur de la chaîne carbonée (de 14 à 17, à 18 et de 19 à 22 atomes de carbone), on obtient les proportions relatives suivantes :

	Pollen			Styles		
	S ₁	Bb	Bg	S ₁	Bb	Bg
C14-C17	43,54	45,22	43,16	71,46	61,99	52,65
C18	38,76	38,84	43,65	21,34	33,69	31,70
C19-C22	17,69	15,93	13,18	7,19	4,31	15,64

Les résultats montrent que la longueur de la chaîne carbonée permet de différencier pollen et style vierge : les pistils sont caractérisés par des acides gras moyens et en C18 alors que les pollens possèdent en général une chaîne carbonée plus longue et sont relativement plus riches en C18.

En conclusion, les acides gras des sulfatides des pollens et des styles vierges sont indépendants du génotype d'incompatibilité mais caractérisent le tissu étudié ; pour le style : degré de saturation élevé, forte teneur en composants à nombre impair d'atomes de carbone, chaîne carbonée plus courte que pour le pollen. Nous remarquons que ces résultats sont remarquablement convergents avec ceux obtenus pour les GSL neutres.

L'état membranaire qui dépend en partie de la nature des acides gras est donc différent dans le pollen et dans le style vierge.

e. évolution au cours de la pollinisation : la comparaison de la structure des acides gras des sulfatides des styles soumis à une pollinisation compatible avec celle des styles vierges, permet de déduire les faits suivants :

- pondéralement, les acides gras saturés, courts et moyens, diminuent ; les acides gras en C18 et C19-C24 ont tendance à augmenter après pollinisation. Un schéma analogue s'observe pour les AG insaturés (augmentation de la longueur de chaîne qui n'est cependant pas la même pour tous les clones) ;
- le même phénomène s'observe après autopollinisation : diminution relative de la teneur en acides gras courts et moyens, saturés ou non.

f. distribution des bases à longue chaîne (tableau 67) : l'analyse de la répartition des bases à longue chaîne des sulfatides du pollen et des styles met en relief l'importance pondérale de la sphingénine et de la

TABLEAU 67 : RÉPARTITION DES BASES A LONGUE CHAÎNE CONSTITUTIVES DES SULFATIDES.

1977

	pollen Bg	pollen S ₁	pollen Bb	styles vierges S ₁ S ₂	styles autopol. S ₁ S ₂ X ₃ S ₁ S ₂	styles vierges S ₁ S ₁	styles xénopol. S ₁ S ₁ X ₃ S ₂ S ₁	styles autopol. S ₁ S ₁ X ₃ S ₁ S ₁	styles vierges S ₂ S ₁	styles autopol. S ₂ S ₁ X ₃ S ₂ S ₁	styles xénopol. S ₂ S ₁ X ₃ S ₁ S ₁
d16 0 + t17 0	1,07	6,12	3,43	8,24	6,28	3,33	10,11	10,53	3,57	5,55	13,20
d16 1 + t17 1	9,98	13,25	4,63	5,06	7,24	5,33	11,50	19,08	1,60	12,24	1,43
d17 0 + t18 0	7,12	3,28	4,37	2,78	3,02	6,14	5,80	16,83	16,74	4,88	14,60
d17 1 + t18 1	6,60	5,97	0,59	2,59	5,52	2,66	3,87	9,74	1,78	5,04	25,50
d18 0 + t19 0	19,00	20,03	11,17	5,55	5,32	11,80	16,57	5,20	7,27	8,11	2,38
d18 1 + t19 1	9,06	4,12	49,12	39,38	28,80	30,98	13,40	5,86	36,54	16,86	6,35
d19 0 + t20 0	15,30	8,61	12,07	15,93	15,45	9,78	10,40	11,35	6,98	16,62	6,65
d19 1 + t20 1	6,51	3,12	6,06	8,73	14,43	6,44	4,00	7,45	6,11	7,68	5,10
d20 0 + t21 0	15,75	23,36	5,32	6,34	8,36	12,19	8,20	7,63	12,13	13,21	10,08
d20 1 + t21 1	9,60	12,13	3,23	5,39	5,57	11,34	16,14	6,32	7,27	9,80	14,70
TOTAL	99,99	99,99	99,99	99,99	99,99	99,99	99,99	99,99	99,99	99,99	99,99
insaturées	41,75	38,59	63,63	61,15	61,56	56,75	48,91	48,45	53,30	51,62	53,08
saturées	58,24	61,40	36,36	38,84	38,43	43,24	51,18	51,54	46,69	48,37	46,91

nonadécasphingénine, qui représentent pour les 3 clônes étudiés au moins 30 % de l'ensemble des bases stylaires.

La sphinganine et l'hydroxynonadécasphinganine, en quantité abondante dans les 3 génotypes, caractérisent le pollen ; le style, pour sa part, est remarquable par des quantités notables de nonadécasphingénine et d'eicosasphingénine. Nous pouvons observer que les bases stylaires sont, en général, moins saturées que les bases polliniques.

Au cours de la phase progamique, le degré de saturation augmente en autopollinisation pour tous les clônes étudiés tandis qu'en xéno-pollinisation, les variations observées sont plus faibles : les bases de type pollinique augmentent cependant (d18 : 0 et t19 : 0 en particulier). Notons qu'en autopollinisation, l'évolution des bases ne peut être schématisée ; il existe, en effet, une nette opposition pour deux bases : d18 : 0 et t19 : 0 (elles diminuent dans les génotypes Bb et S₁, mais augmentent pour Bg) ; en compatibilité, ces mêmes bases subissent une évolution en sens inverse (les génotypes Bb et S₁ présentent une augmentation et Bg une diminution).

L'évolution est encore plus tranchée pour le couple d19 : 1, t20 : 1 qui augmente en autopollinisation et diminue en xéno-pollinisation pour les 3 génotypes.

En conclusion, les BLC des styles sont caractéristiques du type de pollinisation : elles évoluent vers un comportement analogue à celui des styles vierges en autopollinisation ; ceci les différencie nettement des styles xéno-pollinisés pour lesquels ces mêmes bases évoluent vers un type de métabolisme analogue à celui du pollen.

5-conclusion et discussion : Le tableau 68 schématise les résultats enregistrés ; globalement la teneur en sulfatides est très sensiblement plus importante dans le pollen que dans le style vierge ; la pollinisation induit une redistribution appréciable des teneurs en sulfolipides : l'autopollinisation s'accompagne d'une importante augmentation des taux en sulfatides bien supérieure à l'augmentation enregistrée après croisement compatible.

Les acides gras des pollens se différencient par une saturation plus élevée et une longueur de chaîne plus grande ; les bases à longue chaîne des styles vierges sont, par contre, plus saturées. La pollinisation incompatible est liée à une augmentation des taux d'acides gras longs et à un degré de saturation des bases plus élevé.

Les sulfolipides, par les charges négatives qu'ils portent, ont une affinité prononcée pour les cations. Ils jouent donc un rôle de transport ionique et

dans les mouvements d'eau à travers la membrane (HITCHCOCK et NICHOLS, 1975). Il est de plus bien établi qu'il existe une relation entre la distribution des sulfatides et l'ATPase Na et K dépendante dans les tissus animaux et végétaux. Les sulfatides interviennent donc dans les mouvements des ions et de l'eau à 2 niveaux.

Or, en cas de pollinisation incompatible, le tube pollinique en cours de croissance consomme énormément d'oxygène et établit des échanges avec les tissus environnants ; en particulier d'importants mouvements d'eau ont lieu entre les tissus conducteurs stylaires et le tube pollinique. Ce phénomène peut être relié à la présence de fortes concentrations en sulfatides, qui peuvent être à la base des mouvements d'eau par mobilisation intensive d'ions à l'intérieur du tube pollinique : le blocage de la croissance pourrait alors être la conséquence de l'équilibre osmotique entre les cellules du tissu conducteur stylaire et le contenu du tube pollinique.

La modification de la structure des acides gras et des bases à longue chaîne constitutives, allant dans le sens d'une baisse de la fluidité et de la perméabilité membranaire interviendrait alors comme un autre facteur tendant à bloquer les échanges entre le tube pollinique et le style provoquant ainsi l'autoincompatibilité.

Ces résultats sont à rapprocher de ceux obtenus pour les GSL neutres : après autopollinisation, on enregistre également une forte augmentation de la longueur des chaînes des acides gras et des bases qui conditionnent la perméabilité membranaire.

CHAPITRE III : DISCUSSION ET CONCLUSION

A. RESULTATS DES ANALYSES BIOCHIMIQUES.....	128
1) Bilan des acides aminés.....	128
2) Analyse des protéines.....	129
3) Bilan des analyses lipidiques.....	133
<i>a-étude comparative des lipides des pollens et des styles</i>	
<i>b-biochimie de la pollinisation</i>	
B. INTEGRATION DES RESULTATS DANS LES MODELES EXPLICATIFS DE L'AIG.....	141
1) Modèles pour la reconnaissance et la régulation de la réponse incompatible des systèmes AIG.....	141
<i>a-analogie avec les réponses immunitaires</i>	
<i>b-analogie avec les systèmes induction-répression des microorganismes</i>	
<i>c-théories enzymatiques</i>	
2) Comparaison des différents modèles.....	145

CHAPITRE III : DISCUSSION ET CONCLUSION

A. RESULTATS DES ANALYSES BIOCHIMIQUES

L'étude biochimique des réactions de reconnaissance et de rejet qui suivent la pollinisation incompatible permet de dégager un certain nombre de données intéressantes qui peuvent s'intégrer à l'intérieur d'un métabolisme complexe dont tous les mécanismes sont loin d'être élucidés. Les résultats obtenus, schématisés dans le tableau récapitulatif 69, nous permettent de dégager les faits suivants :

I - BILAN DES ACIDES AMINES

La signification des teneurs en amino-acides libres du pollen et des styles vierges ainsi que de leur évolution au cours de la phase de germination et de croissance du tube pollinique n'est pas simple à interpréter ; en effet, comme les acides aminés sont concernés par des métabolismes divers (schéma de BANDURSKI et PISKORNIK, 1973) (tableau 70) ; le bilan des acides aminés et leur évolution au cours des processus de pollinisation représentent une "photographie" métabolique à un instant donné ; il n'est

TABLEAU 69 : RECAPITULATIF GENERAL

CLONES	POLLEN						STYLES											
	S ₁			Bb			S ₁			Bb			S ₁			Bb		
	ALLELES			S ₁ et S ₂			S ₂ et S ₄			S ₁			S ₁			Bb		
TYPE DE CROISEMENT	S ₁			S ₁ et S ₂			S ₂ et S ₄			S ₁			S ₁			Bb		
BILANS	S ₁			S ₁ et S ₂			S ₂ et S ₄			S ₁			S ₁			Bb		
ACIDES AMINES	Asp, Thréo, Ser, Glu, Pro, Gly, Ala, But α NH ₂ , Val, Ileu, Leu, Tyr, Pheala, But γ NH ₂ , Orn, Lys, His, Arg, Ethanolamine.			REMARQUES			Asp, Thréo, Ser, Glu, Pro, Gly, Ala, But α NH ₂ , Val, Ileu, Leu, Tyr, Pheala, But γ NH ₂ , Orn, Lys, His, Arg, Ethanolamine.			REMARQUES			Asp, Thréo, Ser, Glu, Pro, Gly, Ala, But α NH ₂ , Val, Ileu, Leu, Tyr, Pheala, But γ NH ₂ , Orn, Lys, His, Arg, Ethanolamine.			REMARQUES		
Teneur en A.A. (en nanomoles/gramme)	7571	8383	5234	1317	1318	802	3364	3294	3103	2578	1606							
Evolution en fonction du temps							Evolution variable, glu augmente régulièrement.						Evolution variable, notamment forte baisse de proline et pic à 42 heures pour Asp, Glu, Threo, Ser, Ala, Val, But γ NH ₂ .					
PROTEINES (après électrophorèse préparative et chromatographie de gel filtration sur G100 et Sépharose 4B)							1 seul pic à 278 nm (F ₁ A ₁)						2 pics à 278 nm (F ₁ A ₁ , F ₁ A ₁ ')					
GLYCANNES-HYDROLASES (en unités spécifiques)	agal			Activité Rgal relative élevée pour Bb et Activité N-acétyl glc élevée pour S ₁			agal			Baisse de l'aman.			agal			Forte augmentation de l'agal en xénopollinisation demi compatible.		
LIPIDES	oléate et arachidonate de méthyle			Pas de différences selon les clones			oléate et arachidonate de méthyle			Pas d'esters méthyliques d'acides gras			oléate et arachidonate de méthyle			Pas d'esters méthyliques d'acides gras		
-esters méthyliques d'acides gras	caprique palmitique linoléique			Différence entre les clones pour caprique et linoléique			palmitique linoléique			Pas d'acide caprique			palmitique linoléique			Pas d'acide caprique : pas de modification en xénopollinisation.		
-acides gras des lipides totaux	PE, PC, PS, PI			Teneur en PI plus faible pour le clone Bg			PE, PC, PS, PG			Pas de PI mais présence de PG			PE, PC, PS, PG			Pas de modification en xénopollinisation.		
-phospholipides	1,07	1,05	1,45	0,42	0,16	0,14	0,15	0,16	0,14	0,21	0,19							
-P lipidique (% par rapport au PF)				Teneur relative plus élevée dans le pollen surtout pour le clone Bg						Teneur relative min élevée								
-A.G. des phospholipides	palmitique linoléique			Pas de différence selon les clones			palmitique linoléique			Linoléique présent dans le style			palmitique linoléique			Linoléique présent dans le style		
-glycosphingolipides .GSL totaux (nanomoles/g de tissu)	94,4	91,3	87,7	20,6	23,3	25	40,6	60	44	70,5	48,5	61,5						
.GSL acides (nanomoles/g de tissu)	34	27	32	1,3	3	1,5	2,6	5	6	2	2	2						
.CER	5,4	6,3	7,0	7,0	10	10	13	23	13	16	13	7						
.MGCer	31	32	28	8	5	8	18	20	18	40	35	30						
.DGCEr	15	16	13	1,8	2	3	4	8	5	8	6	5						
.TGCEr	6	5	5	1,5	2,5	1,5	1,2	2	0,7	2,5	2,5	1,8						
.TrGCEr	3	5	3	1	1,8	1,1	1,8	2	1,3	2	3	3						
.A.G. des GSL neutres	palmitique stéarique oléique linoléique			Pas de différence selon les clones (AG caractéristique : linoléique)			palmitique stéarique oléique linoléique			Pas de différence selon les clones (AG caractéristique stéarique)			palmitique stéarique oléique linoléique			Apparition d'AG "longs" Disparition d'AG "courts"		
% de saturation rapport I/P longueur de chaîne	55,6	53,1	52,3	67	77,2	69,8	61,3	64,2	66,1	51,4	65,4	60,8						
.BLC	d20 : 0 d19 : 1	d20 : 0 d19 : 1	d20 : 0 d19 : 1	d17 : 0	d17 : 0	d17 : 0	d17 : 0	d17 : 0	d17 : 0	d17 : 0	d17 : 0	d17 : 0						
% de saturation longueur de chaîne	d20:0, d19:1	d19 : 1	d19 : 1	d17:0, d17:1	d17:0, d20:1	d19:0, d20:0	d17:0, d17:1	d16:0, d17:0	d16:0, d17:0	d18:0, d20:0	d20:0, d17:0	d20:0, d19:1						
.CER	d20:0, d19:1	d20:0, d19:1	d20:0, d19:1	d17:0	d17:0	d17:0	d16:0, d18:1	d17:0, d18:0	d17:0, d20:0	d17:0, d18:1	d17:0	d17:0						
.MGCEr	d20:0, d19:1	d20:0, d19:1	d20:0, d19:1	d17:0	d17:0	d17:0	d19:1	d20:0, d19:1	d20:0, d19:0	d19:0	d18:1	d20:0, d18:1						
.DGCEr																		
.TGCEr																		
.TAGCEr																		
.Copule osidique	glc	glc	glc	glc	glc	glc	glc	glc	glc	glc	glc	glc						
.Sulfatides : A.G.	palmitique stéarique oléique			Oléique abondant dans le pollen			palmitique stéarique oléique			palmitique stéarique oléique			palmitique stéarique oléique			palmitique stéarique oléique		
% de saturation rapport I/P longueur de chaîne	73,5	75	68,9	88	85	79,6	88	85	79,6	86,05	83,05	78,22						
.BLC	d18:0, t19:0	d18:0, t19:0	d18:0, t19:0	d18:1, d19:1	d18:1, d19:1	d18:1, d19:1	d18:1, d19:0, d19:1	d18:1, d19:0	d18:1, d19:0	d17:1, d18:0, d20:1	d17:1, d18:0, d20:1	d17:1, d18:0, d20:1						
% de saturation																		



pas possible de savoir a priori vers quelle orientation métabolique particulière va s'engager chaque acide aminé : d'une part, les possibilités d'interconversion sont très grandes, et d'autre part, le turn-over des protéines structurales et enzymatiques implique un continuel va et vient entre la forme libre et la forme liée. Bien que les teneurs en acides aminés apolaires sont significativement plus élevées dans les protéines de membrane que dans les autres protéines, le bilan des acides aminés libres n'autorise pas une hypothèse précise quant à leur devenir.

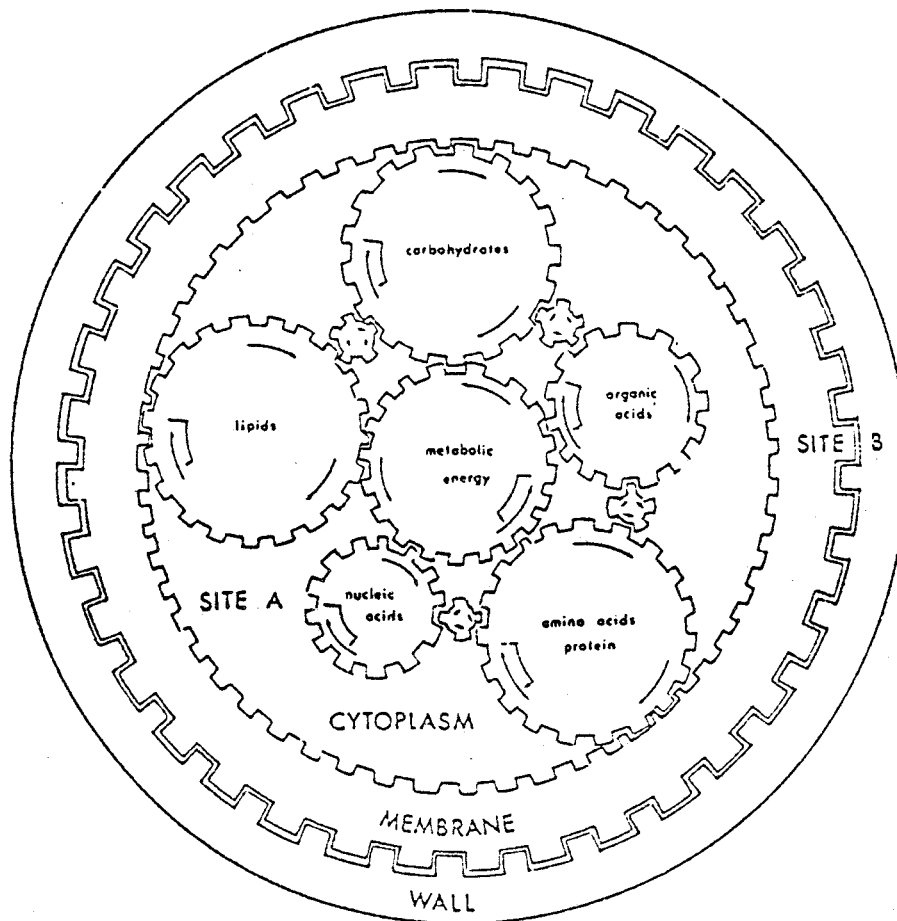
Cependant, un rôle plus spécifique de facteur de croissance pour le tube pollinique germant *in vitro* (SAWADA, 1958) a pu être attribué à certains acides aminés ; de plus, la proline joue un rôle particulier dans la paroi des cellules végétales en cours de croissance (LAMPART, 1972) : en effet, les parois primaires contiennent une protéine riche en hydroxyproline (l'extensine) qui assure par liaison glycosidique avec les polysaccharides de la paroi, la cohésion de l'ensemble ; la croissance cellulaire assurée par la rupture de ces liaisons, serait sous le contrôle de l'AIA (BANDURSKI et PISKORNIK, 1972). L'abondance de proline du pollen peut donc être reliée à son rôle dans l'élaboration de la paroi du tube pollinique en cours de croissance. La réaction d'arrêt pourrait être interprétée comme résultant de la diminution du taux de proline dans le style autopollinisé.

Ces travaux, déjà anciens, devraient être repris, en particulier pour suivre l'incorporation de la proline dans la paroi du tube pollinique ; à cet effet, il serait intéressant de suivre le devenir de la proline marquée au C¹⁴ ; de plus, le rôle éventuel de l'AIA dans ce mécanisme devrait être défini.

II - ANALYSE DES PROTEINES

L'analyse des protéines stylaires et polliniques dont le rôle est fondamental dans la plupart des théories sur le mécanisme de l'autoincompatibilité (détaillées dans le paragraphe suivant) apporte des éléments qu'il faudrait préciser : après électrophorèse préparative et chromatographie de gel filtration, il apparaît qu'une fraction protéique nouvelle est identifiée dans les styles ayant subi une pollinisation compatible ; la plus grande prudence s'impose dans l'interprétation de ce résultat, car les difficultés d'analyse, en particulier l'impossibilité d'extraire sélectivement toutes les protéines

REPRESENTATION SCHEMATIQUE DES DEUX SITES D'ACTION POSSIBLE
DE L'AUXINE AU NIVEAU DE LA PAROI CELLULAIRE



Le site B 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).

sans qu'elles soient associées à des pigments, ne permettent pas d'affirmer avec certitude que cette protéine est liée à la réaction de rejet ; les modifications quantitatives des teneurs en protéines devront donc être analysées plus finement, lorsque les techniques d'extraction et d'isolement permettront de séparer les protéines solubles des tissus sans qu'elles puissent être liées ou dénaturées, par les pigments ou les dérivés polyphénoliques issus en particulier, du système vacuolaire.

L'apparition d'une protéine spécifique du croisement compatible est un résultat à comparer avec celui obtenu chez *Petunia hybrida* où, une analyse effectuée dans des conditions identiques (LANIEZ, 1970) montre qu'une fraction protéique (plus précisément glycoprotéique) disparaît du style après autopollinisation. Il serait alors intéressant d'isoler ces composés et d'en déterminer la structure et la (ou les) fonction(s) par des méthodes physiologiques (rôle dans la germination du tube pollinique *in vivo* et *in vitro*). De plus, il faudrait définir la spécificité de ces protéines (définie par exemple par leur antigénicité) en relation avec les allèles S, de même que leurs éventuelles propriétés enzymatiques. Le but de cette étude est d'obtenir finalement des marqueurs génétiques c'est à dire des éléments spécifiques de chaque clône dont le devenir et le métabolisme peuvent être suivis dans les différents cas de pollinisation. Enfin, il est nécessaire de connaître leur localisation dans le pistil. Il a, en effet, été démontré chez d'autres espèces, qu'il existe des protéines de surface stigmatique, pouvant jouer un rôle spécifique dans la réaction de reconnaissance (MATTSON et coll., 1974 ; HESLOP-HARRISON et coll., 1975b ; SHIVANNA et SASTRI, 1976 ; SHIVANNA, 1977). Ces protéines ont été identifiées sur les stigmates sécréteurs et non sécréteurs. Dans ce dernier cas, ces protéines se situent sur la pellicule stigmatique et sont présentes dès le stade du bourgeon. La couche de protéines pelliculaire est mise en évidence histochimiquement par son intense activité estérasique non spécifique (SHIVANNA, 1979). Dans le cas de stigmates sécréteurs, des protéines sont présentes dans l'exsudat.

L'implication des protéines de surface stigmatique au cours de la phase de reconnaissance est encore plus évidente depuis les travaux de KNOX et coll. (1976) sur *Gladiolus*. En effet, ces auteurs ont démontré qu'une lectine, la concanavalline A, se fixe spécifiquement sur la pellicule protéique alors que les stigmates de très jeunes bourgeons floraux, qui ne possèdent pas cette pellicule, ne se lient pas à la concanavalline A. Or, chez les

végétaux, la liaison de la concanavalline A n'avait pu jusqu'alors être observée qu'avec des protoplastes, puisque dans la plupart des cas, le plasmalemme est surmonté de la paroi pectocellulosique ; la couche externe de la papille stigmatique fournit donc un modèle pour l'analyse des surfaces des cellules végétales : directement accessible, elle remplit de plus une fonction précise, la reconnaissance cellulaire ; l'étude au microscope électronique à transmission montre que cette pellicule est secrétée à la surface de la cuticule et permet le contact avec la membrane de la cellule stigmatique par l'intermédiaire de canaux dans la cuticule et la paroi cellulaire (KNOX et coll., 1976). L'isolement de ces récepteurs de surface a pu être réalisé. D'autre part, les protéines de la paroi du grain de pollen ont également, semble-t-il un rôle important à jouer dans la réaction d'incompatibilité.

SHIVANNA (1979) interprète ainsi le rôle des protéines au cours de la phase progamique : après pollinisation compatible, le grain de pollen s'hydrate et libère des protéines, localisées dans la paroi du grain de pollen et réparties en 2 couches : les protéines de l'intine, produites par le cytoplasme du pollen, d'origine gamétophytique et les protéines de l'exine, élaborées par le tapis au cours de la maturation du pollen, qui sont sporophytiques. Le processus de reconnaissance serait le résultat de l'interaction entre les protéines de paroi du pollen et les structures de la surface stigmatique.

Les travaux de HOWLETT et coll. (1975) corroborent cette hypothèse. Cet auteur a en effet montré, chez *Cosmos bipinnatus*, que l'application de protéines extraites de la paroi du pollen compatible sur le stigmate, avant pollinisation avec de l'autopollen, peut lever la réaction de rejet.

La différence entre l'incompatibilité sporophytique et gamétophytique s'expliquerait de la façon suivante : chez les premières la libération des protéines de l'exine induit la réaction de rejet caractéristique sous la forme d'un bouchon lenticulaire de callose situé entre la paroi de la cellule et le plasmalemme ; dans le second cas, lorsque l'autoincompatibilité est forte, les bouchons de callose se forment et l'inhibition se produit lorsque le tube pollinique est en contact avec la papille stigmatique ; si le pore de germination est situé en dehors de la papille stigmatique, les protéines de l'exine sont libérées dès l'hydratation du grain de pollen ; les protéines de l'intine sont émises lorsque le tube pollinique touche la papille stigmatique : il se forme alors des bouchons de callose et il y a inhibition ; le déversement des protéines de l'exine ne suffit pas à initier la réaction de rejet.

Lorsque les tubes polliniques sont bloqués à l'intérieur du style (*Petunia*, *Nicotiana*, *Oenothera*) il est logique de penser qu'il y a implication des protéines de l'intine et des protéines du tube pollinique pour initier la réaction de rejet.

Enfin, les protéines de la paroi du pollen sont impliquées dans l'incompatibilité interspécifique ; KNOX a pu lever l'incompatibilité par un mélange de pollen compatible tué et de pollen incompatible vivant au cours du croisement : *Populus deltoïdes* x *P. alba*.

D'autre part, SADAVA et CHRISPPEELS (1973) ont démontré que les glycoprotéines des parois, riches en hydroxyproline, sont synthétisées très rapidement par les polyribosomes cytoplasmiques et s'intègrent dans les constituants celluloses. Ces faits sont à relier avec les résultats de VAN der DONK (1975) qui a prouvé que la synthèse de l'ADN et de l'ARN subissent des modifications importantes dans les premières heures qui suivent l'auto ou la xénopollinisation : ces différences signifient que la reconnaissance et ses conséquences métaboliques ont lieu de façon très précoce sur le stigmate, dès l'apport du pollen.

Il reste néanmoins à localiser *in situ* les protéines de la paroi du pollen et de la surface stigmatique, ainsi que leur implication dans l'interaction pollen - pistil ; de plus, il faudrait situer leur origine et identifier le rôle que chaque composant peut jouer dans la physiologie du pollen, la réceptivité stigmatique, la réaction de reconnaissance et dans l'éventuelle acceptation -ou rejet- du tube pollinique.

Par ailleurs, les modifications du catabolisme énergétique observées dans l'analyse des échanges gazeux respiratoires du pistil (augmentation relativement importante de la consommation d'oxygène pour les organes autopollinisés) peuvent être reliées à la dégradation protéique partielle sensible au cours des premières heures de pollinisation et qui se traduit par une augmentation de la teneur en acides aminés libres ; il semble clair que la réaction incompatible est un processus actif nécessitant une stimulation du catabolisme énergétique. Ce processus semble général (HSIANG, 1951 ; LINSKENS, 1955). Il se retrouve également dans le cas d'incompatibilité interspécifique ; LINSKENS (1964) a en effet mis en évidence un schéma respiratoire tout à fait similaire à celui trouvé dans le cas de croisements autoincompatibles, lorsqu'il pollinise des stigmates de *Petunia* avec du pollen issu de *Salpiglossis*.

Une étude plus précise à l'aide de microélectrodes de Clarke (LINSKENS et SCHRAUWEN, 1966) à l'intérieur de styles d'*Hippeastrum hybridum* permet de constater une consommation relativement plus importante d'oxygène à l'extrémité des tubes polliniques en cours de croissance ; après leur passage à un niveau donné dans le style, la teneur en oxygène de celui-ci remonte.

Ces faits expérimentaux montrent l'importance de l'intensité respiratoire pour les tubes polliniques à l'intérieur des tissus stylaires. L'augmentation de la consommation d'oxygène en situation incompatible peut être interprétée comme une augmentation de la synthèse des composés qui assurent la réaction de rejet ou par une modification de la nature du substrat catabolisé. Une autre hypothèse plausible est qu'il y a déséquilibre entre les voies métaboliques qui procurent de l'énergie et les nécessaires synthèses de matériaux indispensables à la croissance du tube pollinique.

Enfin, TARA et NAMBOODIRI (1976) ont montré que des facteurs non protéiques peuvent jouer également un rôle, notamment au cours de l'hydratation du pollen et de sa germination ; comme la croissance du tube pollinique préalable à la fécondation nécessite la perméabilité des membranes et l'adaptation de systèmes enzymatiques exactement adaptés aux processus biochimiques locaux (HAVEZ, 1967), nos recherches se sont orientées vers la définition de la structure des lipides membranaires.

III - BILAN DES ANALYSES LIPIDIQUES

Les principaux résultats sont consignés dans le tableau récapitulatif 69. L'interprétation physiologique des différences quantitatives et qualitatives mesurées entre le pollen et le style, entre les génotypes pour un même matériel, entre les styles ayant subi la pollinisation compatible ou non, doit être effectuée avec beaucoup de prudence. Cependant, il est légitime de relier l'hétérogénéité lipidique avec les activités habituellement reconnues à ces molécules ; dans le problème qui nous occupe, les lipides peuvent intervenir dans le processus de croissance du tube pollinique, dans la perméabilité des membranes, dans la reconnaissance cellulaire, dans la production et la transmission du signal.

Nous avons porté l'analyse successivement sur les esters méthyliques d'acides gras, les AG des lipides totaux, les phospholipides et leurs composants, les glycosphingolipides neutres (AG, BLC et copule osidique),

les sulfatides (AG et BLC) ; sur les constituants hydrophobes des GSL neutres et acides, nous avons surtout envisagé la longueur de chaîne ainsi que le pourcentage de saturation, éléments qui peuvent intervenir dans la structure et partant, dans l'activité membranaire au cours de la réaction qui suit la pollinisation.

a) Etude comparative des lipides des pollens et des styles.

1-comparaison des bilans entre les différents génotypes :

.pollen : l'analyse comparative des résultats présente globalement une grande homogénéité pour les génotypes S_1S_1 , S_1S_2 et S_2S_4 . Il existe cependant des différences, notamment pour le clone Bg (S_2S_4) : pourcentage de P lipidique supérieur, teneur en phosphatidylinositol plus faible ; absence d'acide caprique et présence d'acide linoléique dans les acides gras totaux ; teneur en sulfatides inférieure à celle du pollen des autres génotypes.

Il est tentant de mettre en parallèle ces différences avec l'absence de l'allèle S_1 mais la prudence s'impose d'autant plus qu'elles ne se retrouvent pas dans les styles correspondants ; en tout cas, une étude ultérieure, avec du pollen issu de plantes d'autres génotypes s'avère nécessaire.

.styles : l'homogénéité des structures lipidiques est encore plus remarquable pour les styles vierges. La teneur en P lipidique est ici plus élevée dans le génotype S_1 et n'apparaît pas significative. Qualitativement, nous avons retrouvé les mêmes constituants pour toutes les analyses.

2-comparaison pollen - style : Les variations observées sont, ici, significatives : pollen et styles s'opposent souvent par les teneurs qualitatives et quantitatives des constituants lipidiques : on peut définir un véritable profil pollinique et stylaire :

Profil pollinique	Profil stylaire
- présence d'oléate et arachidonate de méthyle	- absence d'esters méthyliques d'acides gras
- présence d'acide caprique dans les lipides totaux (sauf pour Bg)	- absence d'acide caprique
- teneur en P lipidique élevée	- teneur en P lipidique faible
- présence de phosphatidylinositol	- absence de phosphatidylinositol
- absence de phosphatidylglycérol	- présence de phosphatidylglycérol

- | | |
|--|--|
| <ul style="list-style-type: none"> - peu d'acide linoléique dans les AG des phospholipides - forte teneur en GSL totaux
forte teneur en GSL acides
forte teneur en GSL MGCer
forte teneur en GSL DGcer - <u>AG des GSL</u> :
linoléique surtout
% saturation faible
% d'AG impairs faible
AG longs - <u>BLC</u> longs et insaturés - <u>sulfatides</u> : teneur élevée - <u>AG</u> :
saturation faible
AG impairs faibles
AG longs - <u>BLC</u> : saturation élevée | <ul style="list-style-type: none"> - abondance d'acide linoléique dans les AG des phospholipides - faible teneur en GSL totaux
faible teneur en GSL acides
faible teneur en GSL MGCer
faible teneur en GSL DGcer - <u>AG des GSL</u> :
stéarique surtout
% saturation élevé
% AG impairs élevé
AG courts - <u>BLC</u> plus courts et saturés - <u>sulfatides</u> : teneur faible - <u>AG</u> :
saturation élevée
AG impairs élevés - <u>BLC</u> : saturation faible |
|--|--|

b) Biochimie de la pollinisation.

Les variations qualitatives et quantitatives observées montrent une divergence entre les réponses compatible et incompatible (tableau 69) : les faits les plus saillants sont :

- pour les phospholipides : aucune différence n'est sensible, ni pour le pourcentage de P lipidique, ni dans la nature des phospholipides identifiés, ni dans la composition en acides gras ;
- pour les glycosphingolipides neutres :
 - .en xénopollinisation : augmentation des GSL totaux et parmi eux surtout les Cer et MGCer
 - .en autopollinisation : augmentation moins forte des GSL totaux ; répartition plus uniforme des GSL entre les différentes classes ;
- pour les constituants des GSL neutres :
 - .en xénopollinisation : abondance des AG à chaîne courte, désaturés ; abondance des BLC à nombre moins important d'atomes de carbone, saturés
 - . en autopollinisation : abondance des AG à chaîne longue, saturés ; abondance des BLC "courtes" et saturées ;
- pour les sulfatides : la teneur en sulfatides après autopollinisation est bien supérieure à celle observée après xénopollinisation ; en autopollinisation comme en xénopollinisation : baisse des AG courts ; augmentation du degré de saturation en xénopollinisation.

L'hétérogénéité lipidique peut être rapprochée des fonctions connues de ces lipides.

1-dans les processus de croissance : Les esters méthyliques d'acides gras naturels (en particulier l'oléate de méthyle) peuvent stimuler l'action d'hormones végétales telles que les auxines ou gibbérellines qui interviennent dans le processus de croissance (STOWE, 1960). La présence d'esters méthyliques comme l'oléate et l'arachidonate de méthyle, exclusivement dans le pollen pourrait être en relation avec ce rôle.

Par contre, TSO (1964) a démontré l'action inhibitrice sur la croissance des acides gras à chaîne courte : or, c'est précisément dans les styles vierges et pollinisés que l'acide caprique est absent ; c'est deux faits ne semblent pas en relation avec le phénomène d'autoincompatibilité mais sont peut être des éléments importants dans la croissance du tube pollinique.

Les phospholipides pourraient, aussi, jouer un rôle : en effet, WEIGL (1969) a démontré que l'acide β indolylacétique s'associe préférentiellement à la phosphatidylcholine membranaire. Cette fixation, préalable à toute action auxinique, peut également être située dans le processus général de la croissance, car aucune modification qualitative dans les compositions en phospholipides n'a été constatée dans les styles vierges ou pollinisés.

Par contre, la différence de répartition des glycosphingolipides suivant la pollinisation peut être rapprochée de celle des glycolipides dans les cellules 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 des chaînes polysaccharidiques ; or, nous avons constaté en xéнопollinisation une plus grande richesse en céramides et monoglycosylcéramides qu'après pollinisation incompatible ; ce fait semble donc s'appliquer également pour le tube pollinique en cours de croissance active.

De plus, la réorientation de la structure des GSL en situation incompatible est à relier avec la déviation du métabolisme glucidique qui caractérise l'autoincompatibilité : il est établi depuis longtemps que l'autopollinisation incompatible induit dans le tube pollinique et dans le style d'abondants dépôts de callose (enchaînements de glucoses liés en β 1,3) ; la xéнопollinisation, par contre, nécessite l'intervention de systèmes enzymatiques différents aboutissant essentiellement à la biosynthèse de cellulose (polymère du glucose en β 1,4), indispensable pour la croissance de la paroi. Or, BRETT et NORTHCOTE (1975) ont démontré que les oligosaccharides liés aux protéines et aux lipides peuvent être considérés comme des intermédiaires dans la biosynthèse des β glucannes ; il est donc possible de relier ces deux phénomènes et de considérer les étapes de biosynthèse de la cellulose et de

la callose pour mieux apprécier leur rôle éventuel dans la réaction d'incompatibilité.

La biosynthèse de la callose dépend d'une β 1,3 glucanne synthétase fonctionnant comme transférase à partir de l'UDP glucose ; la cellulose dépend d'une β 1,4 glucanne synthétase ayant également une activité transférase. Ces deux enzymes sont compétitives pour le même substrat et diversement activées par l'ion Mg^{++} qui favorise l'une ou l'autre de ces enzymes en fonction de sa concentration. Il est intéressant de noter que la biosynthèse de cellulose est stimulée par l'élévation du pH et par le glucose et la cellobiose.

D'autre part, BRETT et NORTHCOTE ont constaté que la synthèse des β glucannes est catalysée par des enzymes liés aux membranes utilisant l'UDP glucose pour les β 1,3 et β 1,4 glucannes et le GDP glucose pour les β 1,4 glucannes exclusivement. L'activité β 1,4 glucosylsynthétase est associée au plasmalemme et à d'autres ultrastructures cellulaires (dictyosomes, mitochondries, reticulum endoplasmique) ; par contre, la synthèse de callose, semble localisée à la surface cellulaire.

La synthèse de cellulose est contrôlée par l'AIA. L'intervention de cette hormone devrait également être envisagée car elle intervient dans les échanges membranaires : en particulier, l'AIA modifie la pression osmotique, contrôle la perméabilité membranaire et la biosynthèse des éléments de la paroi. A son tour, l'AIA est soumise à une régulation suivant la teneur en protons du milieu ; les protons peuvent provenir de l'acide ascorbique oxydase qui agit sur la forme enediol de l'acide ascorbique en le transformant en acide dihydroascorbique avec libération d'hydrogène, avec comme conséquence l'augmentation des groupements SH par rupture des ponts disulfures des glycoprotéines localisées dans la paroi.

Il existe donc une corrélation entre AIA et biosynthèse de cellulose ou de callose. La réaction d'incompatibilité induit semble-t-il un déséquilibre dans le métabolisme glucidique provoquant une déviation vers la biosynthèse de callose. Ces relations demanderaient également à être précisées.

2-dans la perméabilité : Les variations de la composition en acides gras (pourcentage de saturation et longueur de chaîne) et des BLC (pourcentage de saturation, longueur de chaîne, nombre de groupes OH) sont en relation avec la structure membranaire et donc de ses propriétés physiologiques telles que la perméabilité ; de nombreux auteurs comme HASLAM et coll., 1973 ; DAVIS et coll., 1974 ; WOJCJAK, 1974 ont démontré la relation qui existe entre la

composition en acides gras des lipides membranaires, la perméabilité aux ions et les activités enzymatiques ; en général, la perméabilité aux ions notamment augmente avec le degré de saturation des AG (VAN DEENEN, 1972 ; DAVIS et SILBERT, 1974).

De plus, pour ce qui concerne les seuls GSL, il apparaît que la présence des groupements hydroxy libres et celle d'une liaison amide permet aux céramides d'intervenir à la fois comme donneur de liaison hydrogène et comme accepteur ; cette propriété distingue de façon caractéristique les sphingolipides des glycérolipides (qui ne peuvent fonctionner que comme accepteur).

En général, la présence de groupes hydroxy et amide dans un composé augmente sa polarité et son interaction avec l'eau ; si ces groupes participent à la formation de liaisons hydrogènes à l'intérieur de la matrice lipidique, ils augmentent considérablement la stabilité et l'imperméabilité de la membrane ; ces aspects fonctionnels des groupes hydroxy donneurs sont mis en évidence par le fait que le nombre de résidus hydroxy au niveau des céramides est significativement plus élevé dans les GSL des membranes qui sont exposées à des stress physiques ; les attractions latérales entre chaînes hydrocarbonées à l'intérieur de la membrane sont généralement liées à des forces de VAN DER WAALS et donc assez faibles lorsque les lipides se trouvent sous forme de cristaux liquides ; la formation d'une liaison hydrogène latérale à l'intérieur de la matrice lipophile contribue fortement à l'interaction lipide - lipide et augmente ainsi considérablement la stabilité et l'imperméabilité de la membrane (PASCHER, 1976).

L'addition de groupes hydroxy qui fonctionnent à la fois comme donneurs et accepteurs peut induire la formation de deux liaisons ; si ces liaisons sont dirigées vers des molécules d'eau, l'introduction de chaque OH augmente le contact lipide-eau. Or, les résultats des analyses effectuées sur les constituants des GSL neutres et acides mettent en relief une modification de leur structure après autopollinisation, allant dans le sens d'une augmentation du pourcentage de saturation et de la longueur de chaîne ; il paraît légitime de penser que la baisse de fluidité membranaire qui en résulte modifie la perméabilité, ce qui va aboutir à l'impossibilité pour le tube pollinique d'assurer sa nutrition à partir des éléments puisés dans les tissus stylaires ; on peut également relier ces faits à l'atténuation du phénomène de rejet avec l'augmentation de température : la hausse de la température extérieure peut augmenter la fluidité membranaire, élever la perméabilité et permettre ainsi la nutrition du tube pollinique (DE GIER, 1980).

Par contre, les techniques utilisées ne permettent pas de distinguer les BLC dihydroxylées des trihydroxylées et donc de suivre l'évolution des bases, à ce niveau, au cours de la pollinisation.

3-dans la reconnaissance cellulaire : Nous avons déjà signalé que les glycosphingolipides pouvaient intervenir comme éléments dans la reconnaissance cellulaire.

BURNET (1971) a défini les bases moléculaires de la reconnaissance cellulaire par "la liaison spécifique, réversible ou irréversible entre des constituants chimiques localisés à la surface cellulaire". La reconnaissance mutuelle peut intervenir stériquement entre des molécules complémentaires de façon analogue au complexe enzyme-substrat ou antigène-anticorps. Chez les animaux et les microorganismes, le mécanisme de reconnaissance cellulaire fait intervenir des polysaccharides de surface ; c'est le cas dans l'interaction lectines-lymphocytes (REICHART et coll., 1973), dans l'interaction virus-érythrocytes (LAVER et WEBSTER, 1966), l'agglutination des cellules sexuelles (YEN et BALLOU, 1974), les récepteurs des toxines bactériennes (LUDERITZ et coll., 1966).

Chez les végétaux, le plasmalemme est recouvert par la paroi pectocellulosique : cependant, SMITH (1976) a pu fabriquer, à partir d'extraits tissulaires, des antisérums ayant des déterminants antigéniques présentant une variation taxonomique. De même, l'apparition séquentielle d'antigènes spécifiques embryonnaires dans les caryopses de Maïs en cours de développement implique ces déterminants dans le développement tissulaire (KHAVKIN et coll., 1977).

La spécificité de la réaction de reconnaissance est déterminée par la séquence osidique terminale des glycoprotéines et des glycolipides de surface (WATKINS, 1966). Ce fait a été mis en évidence par l'utilisation de divers types de lectines ou, par exemple, l'association entre des ligands à résidus fucosyl et mannosyl et des récepteurs spécifiques de ces hydrates de carbone à la surface des gamètes préalables à la fécondation chez *Fucus serratus* (BOLWELL et coll., 1979).

L'implication des glycolipides dans le processus de reconnaissance préalable à la réaction incompatible a été démontrée en 1976 par KNOX et coll. : des extraits de surface stigmatique soumis à électrophorèse sur gel de polyacrylamide révèlent la présence de 2 types de composants de nature glycoprotéique et glycolipides.

De plus, il existe d'autres arguments permettant d'effectuer une relation entre les lipides stigmatiques ou polliniques et l'incompatibilité. Ainsi, WILLING et PRYOR (1976) ont mis en évidence que des solvants organiques, en particulier l'hexane, peuvent, lorsqu'ils sont appliqués sur le stigmate avant la pollinisation, lever l'obstacle à la fécondation dans des cas de croisements interspécifiques chez *Populus*.

De même, ROGGEN (1974 et 1975) a mis en relief le rôle des lipoprotéines dans la phase de reconnaissance ; cet auteur fait l'hypothèse que l'hexane, en dissolvant les lipoprotéines de surface, élimine les processus cognitifs préalables à la fécondation.

DICKINSON et LEWIS (1973) ont apporté une série de preuves morphologiques mettant en évidence, au niveau stigmatique, des structures de nature lipidique : le microscope à balayage indique, en effet, chez *Raphanus*, la présence de petites dépressions stigmatiques, de 6 microns de diamètre, bourrées de lipides.

Pour ce qui concerne le pollen, ROBERTS et coll. (1979) ont impliqué les lipoprotéines complexes qu'on trouve dans les cavités de l'exine chez *Brassica* (connue sous le nom de tryphine) dans le processus d'identification. Cette pellicule qui entoure le pollen peut être éliminée par des solvants covalents. De plus, les composants de la tryphine, visibles au microscope électronique à balayage sont totalement extraits par le chloroforme (ROGGEN, 1974).

Cependant, l'organisation des GSL à l'intérieur des membranes est mal connue ; il semble qu'ils soient localisés dans des cryptes intramembranaires.

L'analyse des résultats des teneurs et compositions des GSL des tissus stylaires et du pollen montre qu'il n'existe pas de constituant (en particulier osidique) caractéristique d'un clône ou d'un allèle ; les éléments de spécificité, s'ils existent, sont donc vraisemblablement liés aux séquences osidiques des GSL complexes d'autres composés, par exemple glycoprotéiques. Cette affirmation doit être nuancée car l'étude des GSL plus complexes et en particulier des gangliosides, en cours de réalisation, pourrait apporter d'autres éléments.

Il reste à intégrer ces résultats dans les différentes théories proposées pour expliquer le mécanisme moléculaire de l'AIG.

B. INTÉGRATION DES RÉSULTATS DANS LES MODÈLES EXPLICATIFS DE L'AIG

I - MODELES POUR LA RECONNAISSANCE ET LA REGULATION DE LA REPOSE INCOMPATIBLE DES SYSTEMES AIG

Les modèles proposés sont nombreux. Pour être satisfaisants, ils doivent permettre d'explicitier les faits suivants :

- 1) la réaction est contrôlée par un locus génétique tripartite avec un segment de spécificité et 2 segments d'activité (pour le pollen et pour le style) et dépend de la présence de 2 segments de spécificité identiques dans le pollen et dans le style ;
- 2) l'intervention de très nombreuses séries alléliques au locus S ;
- 3) la détermination tardive du phénotype incompatible du style ;
- 4) la présence d'antigènes spécifiques du gène S dans le pollen ;
- 5) la perte du caractère d'incompatibilité dans le pollen diploïde ;
- 6) la sensibilité de la réaction d'incompatibilité à la chaleur et aux irradiations ;
- 7) l'absence d'interactions entre les tubes polliniques compatibles et incompatibles en cas de pollinisation mixte ;
- 8) une activité génique variable après auto et xéнопollinisation.

Les différents modèles proposés consistent en un processus à 2 étapes avec une étape initiale de reconnaissance suivie d'une phase de réponse qui est le rejet de l'autotube quand les allèles du pollen et du style sont identiques.

Trois catégories de modèles peuvent être distinguées : ceux qui assimilent la réponse à une réaction de type immunitaire, ceux qui présentent une analogie avec les systèmes induction-répression trouvés chez les microorganismes et ceux basés sur un système enzymatique déficient.

a) Analogie avec les réponses immunitaires.

1-EAST (1926-1929) postule que le produit des allèles S du pollen agit comme un antigène, qui est reconnu, au cours de la croissance, par un anticorps du style (produit par un allèle identique).

2-LEWIS (1960) propose une première hypothèse concernant la structure du gène S, à partir de considérations biochimiques et génétiques : l'allèle S coderait deux protéines différentes : une pour le pollen, l'autre pour le style : ces protéines du pollen et du style auraient une configuration complémentaire analogue aux complexes antigène-anticorps ou enzyme-substrat (figure 7A).

b) Analogie avec les systèmes induction-répression des microorganismes.

1-dans la deuxième hypothèse (figure 7B) , LEWIS postule que le locus S est un complexe qui code pour :

- une protéine spécifique commune au pollen et au style (S) ;
- un activateur pour la production d'une protéine dans le tube pollinique (Ap) ;
- un activateur pour la production d'une protéine dans le style (As).

Le gène S produit un polypeptide dont la spécificité déterminée par la structure primaire est différente pour chaque allèle. Chaque polypeptide allélique est une molécule identique dans le pollen et dans le style.

Le polypeptide polymérise en dimère dans le pollen et dans le style.

La première étape de la réaction AI est la formation d'un tétramère par combinaison de 2 dimères identiques provenant du pollen et du style. Cette combinaison se fait à l'aide d'une molécule allostérique.

La deuxième étape est une régulation génique par le tétramère qui peut induire la synthèse d'un inhibiteur ou réprimer la synthèse d'une auxine nécessaire à la croissance du tube pollinique.

Cette hypothèse d'un dimère, produit primaire d'un gène, s'unissant à un dimère identique en impliquant une molécule allostérique, est basée sur la structure des immunoglobulines G.

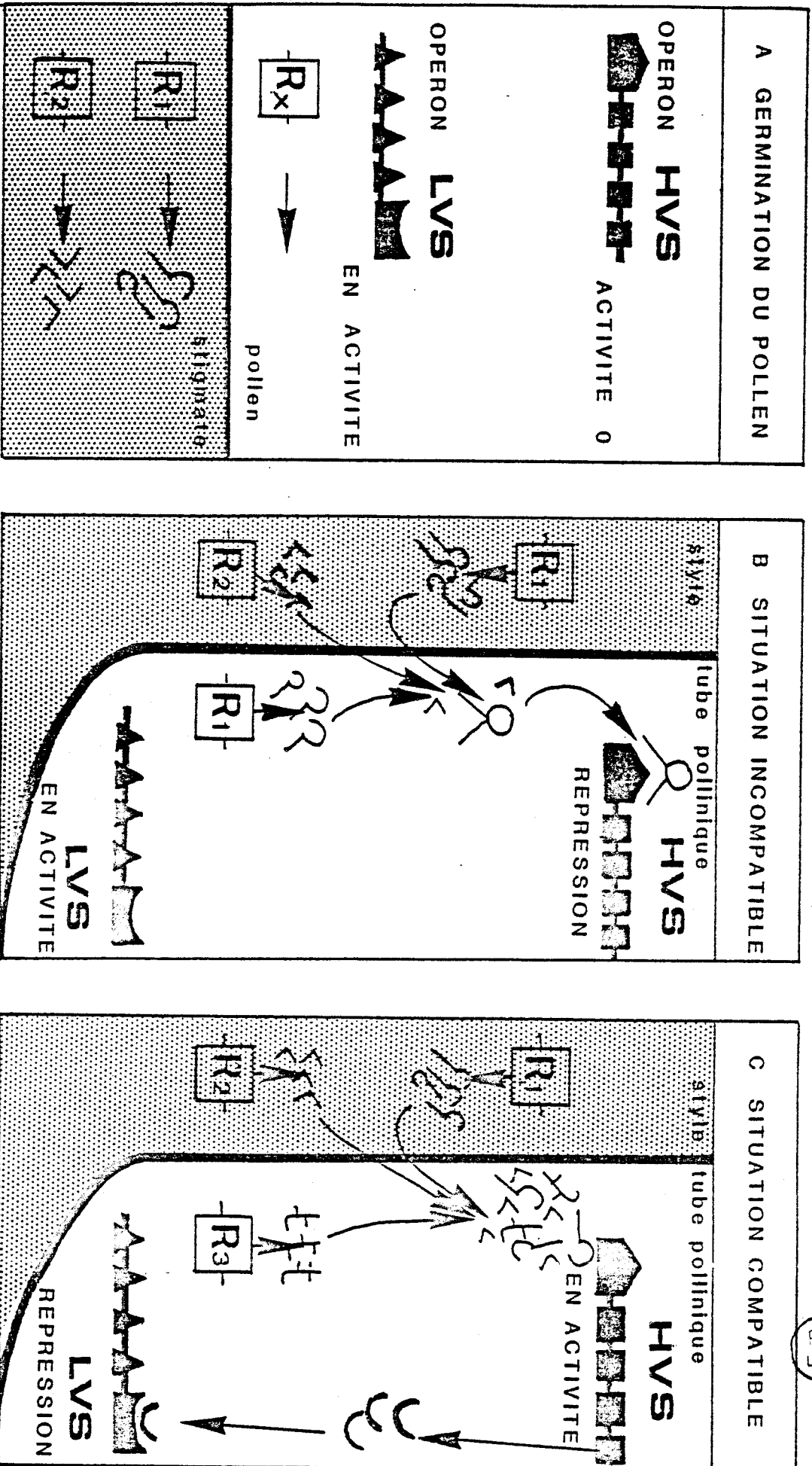
2-modèle d'ASCHER (1966) : Il correspond à une adaptation du modèle de JACOB-MONOD (1961) (figure 71).

Les allèles d'incompatibilité S jouent le rôle de gènes régulateurs : il y a donc 2 gènes régulateurs dans le style diploïde et un gène régulateur dans le tube pollinique.

Ces régulateurs gouvernent un système d'opérons dans le tube pollinique qui contrôlent le métabolisme de ce dernier. ASCHER distingue 2 opérons qui assurent :

FIGURE 71 : STRUCTURE ET FONCTION DU GÈNE S SELON ASCHER (1966).

BUS LILLE



R : Régulateur de l'allèle S

R : Répresseur de l'opéron HVS

R : Répresseur de l'opéron LVS

- un système de croissance lente (ou LVS = low velocity growth system) qui concerne le métabolisme des réserves polliniques et des composés du style : il en résulte la croissance limitée caractéristique des tubes polliniques incompatibles ;

- un système de croissance rapide (HVS = high velocity growth system) qui implique l'utilisation de voies métaboliques différentes : il conduit à la croissance rapide de tubes polliniques compatibles.

Quand les produits des allèles régulateurs du tube pollinique et du style sont semblables, il y a incompatibilité ; ainsi, un grain de pollen en début de germination utilise ses propres réserves et des substances nutritives du style par l'intermédiaire de son système de croissance lente (LVS).

Après pénétration du tube pollinique dans le tissu stylaire, les produits des régulateurs stylaires (allèles S) diffusent dans le tube pollinique, où ils rencontrent les produits de l'allèle régulateur du pollen ; si les produits sont identiques, les 2 molécules forment un dimère répresseur qui s'attache à l'opérateur du système à croissance rapide (HVS). L'opéron ainsi réprimé ne fonctionne pas quand le tube pollinique a besoin des substrats stylaires pour sa croissance. Le métabolisme du tube pollinique va en faiblissant jusqu'à ce que ses propres réserves soient épuisées, d'où la croissance rapidement bloquée du tube incompatible.

Si, par contre, le produit du régulateur pollinique est différent des substances des régulateurs stylaires, aucun régulateur fonctionnel ne peut être formé ; le système HVS peut fonctionner. En plus des cistrons structuraux dans l'opéron HVS, il peut y avoir, un régulateur contrôlant l'opérateur du système LVS. L'activité de ce régulateur se fait par activation de l'opéron HVS et empêche le fonctionnement du système LVS.

En résumé, la reconnaissance et la spécificité de la réaction dépendent de l'analogie qui, lorsqu'elle existe pour un des allèles régulateurs style et pour celui du pollen, aboutit à la formation d'un répresseur fonctionnel qui inhibe le système HVS ; les allèles S du pollen et du style ont la même fonction : produire une demi-molécule de répresseur ; la dimérisation ne peut se produire qu'entre un monomère pollinique et un monomère stylaire. Cette théorie explique l'irréversibilité de l'inhibition de croissance des tubes polliniques incompatibles.

3-hypothèse de LINSKENS (1965) : LINSKENS résume ainsi les diverses théories. Un gène de structure S_1 produit un ARN_m qui conduit à la synthèse d'une protéine spécifique du gène S_1 ; ce processus a lieu de façon identique dans le style et le tube pollinique.

Dans un croisement incompatible S_1S_1 , il y a formation d'un dimère. Ce dimère peut agir comme inducteur d'un gène opérateur normalement réprimé. La molécule inductrice annule la répression de ce gène opérateur et permet la production d'un système inhibiteur.

En résumé, dans les pollinisations incompatibles, la régulation de l'activité du gène S conduit à la production d'un dimère qui induit la formation d'un système inhibiteur ; dans les croisements compatibles, un monomère est produit dérépessant le système promoteur de la croissance.

Toutes les théories énoncées précédemment (analogie aux systèmes immunitaires ou aux systèmes induction-répression) possèdent un élément commun : la synthèse d'une substance spécifique dans le tube pollinique et le style et c'est l'interaction entre ces produits spécifiques du gène S qui provoque ou non la reconnaissance AI. On ne possède cependant aucun élément sur ces substances. Sont-elles identiques ou possèdent-elles des structures stériques complémentaires ? Après la phase de reconnaissance vient la phase de réponse. Comment l'inhibition a-t-elle lieu ? C'est la question à laquelle ces théories répondent différemment : induction des systèmes inhibiteurs (LEWIS, 1965), répression des systèmes de croissance (LEWIS, 1965 ; ASCHER, 1966 ; PANDEY, 1975) ou dérépession des systèmes inhibiteurs (LINSKENS, 1965).

c) Théories enzymatiques.

1-STRAUB (1947) a proposé une hypothèse d'après laquelle le gène S induit dans le pollen la synthèse d'une substance spécifique en quantité définie, nécessaire à la croissance du tube pollinique. En présence d'un allèle S identique dans le tissu conducteur, un système spécifique est formé qui inactive la substance du tube pollinique et le prive d'un métabolite indispensable.

2-KROES (1973) base son hypothèse sur le fait que les pollens d'allèles S différents sont distincts entre eux non par une substance qu'ils synthétiseraient mais par celle dont ils manqueraient :

- la présence dans le grain de pollen d'un allèle S spécifique correspond à l'absence d'un enzyme spécifique ;

- la présence dans le style d'un allèle S spécifique correspond à la formation d'un complexe spécifique dans lequel un élément nécessaire à la croissance du tube pollinique (monosaccharide ou un élément inorganique tel que le bore) est lié à une protéine. Comme le style est diploïde et peut contenir deux allèles S différents, l'élément peut être lié à 2 molécules protéiques différentes.

Exemple : le pollen S_x ne possède pas l'enzyme E_x

un style $S_x S_y$ synthétise un complexe protéique $P_x N P_y$ où N est l'élément nécessaire à la croissance du tube.

Le pollen a besoin des enzymes E_x et E_y pour libérer N de son complexe ; dans un style $S_x S_y$, ni le pollen S_x , ni le pollen S_y ne peuvent y arriver.

Ainsi, chaque tube pollinique est capable de synthétiser tous les enzymes nécessaires à la destruction du complexe stylaire, exception faite d'un seul enzyme correspondant à l'allèle S qu'il porte.

En faveur de cette hypothèse :

1) la similitude entre la croissance du tube pollinique dans le style et celle d'un mycélium : le tube pollinique, comme l'hyphe, a besoin d'enzymes pour incorporer des substances du milieu de culture ;

2) le fait que la croissance du tube pollinique incompatible n'est pas nulle ; elle dépend de la quantité de réserves du pollen et de son aptitude à prélever des substances dans le style ;

3) la thermosensibilité de la réaction et le rôle des cutinases dans le système AIS.

II - COMPARAISON DES DIFFERENTS MODELES

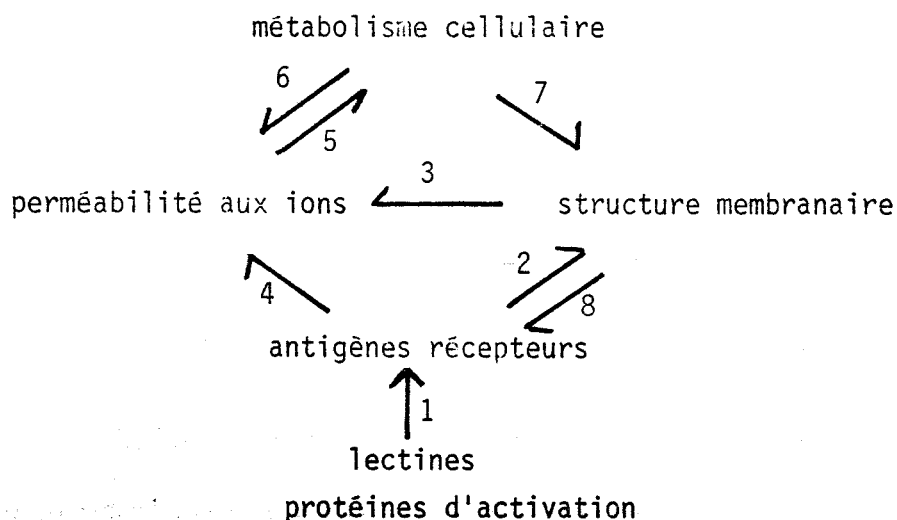
Les théories que nous venons de résumer apportent des éléments de réponse à un mécanisme dont les modalités d'expression apparaissent très diversifiées ; les travaux expérimentaux n'ont pu, jusqu'à présent, identifier de façon décisive les molécules intervenant dans le phénomène. Cependant, l'hypothèse d'ASCHER qui prend en compte la quasi totalité des événements qui se succèdent pendant la phase progamique semble très plausible, bien que les produits de l'activité des opérons n'aient jamais pu, jusqu'à présent, être identifiés.

Notre travail ne se situe pas du même point de vue ; il se cadre essentiellement dans l'analyse des structures spécifiques qui interviennent dans la reconnaissance, et du signal membranaire déclenchant la réorientation métabolique ; c'est pourquoi, nous nous proposons dans nos perspectives de recherche d'étayer un modèle faisant intervenir la fixation, sur des sites spécifiques du tube pollinique, de substances d'activation ayant une influence directe ou indirecte sur la perméabilité membranaire.

En effet, il est désormais établi que les réactions immunologiques ont un effet sur la perméabilité des membranes aux cations. Les antigènes et les récepteurs de surface sont considérés comme faisant partie des

constituants membranaires impliqués dans les systèmes de transport des cations (LAUF, 1965).

Dans les cellules vivantes, la perméabilité aux cations est fonction de la structure membranaire et est interdépendante du métabolisme cellulaire ce qui peut être schématisé de la façon suivante :



Les lectines, ainsi que les activateurs ou inhibiteurs de nature protéique peuvent agir sur la perméabilité cellulaire soit directement (voie 4), soit indirectement (voie 2-3) ; la perméabilité de la membrane aux cations peut être modifiée par de telles molécules de plusieurs façons : activation ou inactivation des sites de transport, changement de paramètres cinétiques, effet sur le processus de transport actif et/ou passif. Il est possible de plus que les réactions 1 affectent le métabolisme cellulaire via des changements de perméabilité membranaire (voie 5) et qu'il existe des mécanismes amplificateurs (voie 5-7-3). De plus, les modifications du métabolisme cellulaire, connus pour influencer la perméabilité aux cations et la structure membranaire (voies 6 et 7) peuvent être analysées dans leurs effets sur la distribution et la conformation stérique des antigènes de surface membranaire (voie 8) et leur interaction avec des aspects immunologiques ; une amplification peut également intervenir (voies 7-3-5 et 7-8).

Lorsque l'on connaît le rôle du calcium dans le processus d'élongation du tube pollinique, on conçoit qu'il est possible que les

modifications de perméabilité aux cations soient déterminants dans la réaction d'incompatibilité.

De plus, le mode d'action des protéines d'origine gamétophytique ou sporophytique peut être calqué sur celui des anticorps ou des lectines : en effet, ceux-ci, bien que très différents par leur origine et par leur structure, se montrent capables de modifier le transport des cations dans les biomembranes. La base structurale commune réside cependant dans les sites de combinaison doubles ou multiples de ces molécules qui sont les sites de reconnaissance spécifiques et de liaisons avec les récepteurs membranaires.

Il est possible de penser que le processus qui intervient dans la phase progamique est analogue à celui que l'on peut observer au cours du processus de fécondation chez les Algues. En effet, BOLWELL (1979) a montré que la fécondation chez *Fucus serratus* est conditionnée par l'association entre des ligands à résidus fucosyl ou mannosyl à la surface de l'ovule et des récepteurs spécifiques de ces hydrates de carbone à la surface du gamète.

Dans d'autres cas, il a également été défini que la liaison initiale et la reconnaissance de gamètes est déterminée par l'association de molécules complémentaires spécifiques avec des éléments de reconnaissance localisés sur les surfaces des gamètes ; cette association fait intervenir des hydrates de carbone. Ainsi, plusieurs chercheurs ont mis en évidence le rôle des résidus polysaccharidiques spécifiques dans la reconnaissance entre gamètes en utilisant des lectines notamment chez les Mammifères (LIS et SHARON, 1973 ; CALLOW, 1976) et les Oursins (HOWE et METZ, 1973 ; AKETA, 1975).

C'est donc vers l'identification, la localisation et le blocage des récepteurs de surface que vont s'orienter nos recherches. Dans ce but, nous poursuivrons l'étude analytique des GSL complexes du type des gangliosides, qui peuvent être le support moléculaire de la fonction de reconnaissance ; d'autre part, la fixation de lectines spécifiques et la dégradation enzymatique des oligosaccharides de surface sur le pollen ou sur le stigmate avant pollinisation permettront de préciser si les mécanismes de reconnaissances sont analogues aux systèmes déjà identifiés.

Une autre direction de recherche envisagée concerne l'étude des substances qui se sont révélées être les messagers de l'information : AMP ou GMP cyclique ; de la même façon, le rôle de l'ion calcium accompagné ou non de l'ionophore A 23187 devra être précisé.

B I B L I O G R A P H I E

- ABDALLA M.M.F. et J.C.Th. HERMSEN, 1971. - The plasmon. - genic of pollen lobedness and tetrad in *Solanum verrucosum* hybrids and duplicate linkage groups. *Genetica* 42 : 261-270.
- Ben ABDELKADER A. et P. MAZLIAK, 1970. - Echanges de lipides entre mitochondries, microsomes et surnageant cytoplasmique de cellules de pomme de terre ou de chou fleur. *Eur. J. Bioch.* 15 : 250-262.
- AKETA K., 1975. - Physiological studies on the sperm surface component responsible for sperm egg bonding in sea urchin fertilization. II. Effect of concanavalin A on fertilization capacity of sperm. *Exp. Cell. Res.* 90 : 50-62.
- ALLEN C.F., O. HIRAMAYA et P. GOOD, 1966. - In : "Biochemistry of chloroplasts", vol. 1, Acad. Press N.Y., GOODWIN T.W. ed., 195.
- ANEJA R., J.S. CHADHA et J.D. KNAGGS, 1969. - N-acyl phosphatidylethanolamines : occurrence in nature, structure and stereochemistry. *Biochem. biophys. Res. commun.* 36 : 401-406.
- ANNERSTEDT L. et A. LUNDQVIST, 1967. - Genetics of self-incompatibility in *Tradescantia paludosa* (Comelinaceae). *Hereditas* 58 : 13.
- ARASU N.N., 1968. - Self-incompatibility in Angiosperms : a review. *Genetica* 39 : 1-24.
- ASCHER P.D., 1966. - A gene action model to explain gametophytic self-incompatibility. *Euphytica* 15 : 179-183.
- ASCHER P.D., 1971. - The influence of RNA synthesis inhibitors on *in vivo* pollen tube growth and the self-incompatibility reaction in *Lilium longiflorum* Thunb. *Theoret. appl. Genet.* 41 : 75-78.

- ASCHER P.D., 1974. - The self-incompatibility reaction in detached styles of *Lilium longiflorum* Thunb. injected before pollination with 6-methyl-purine or puromycin. *Incomp. Newslett.* 4 : 57-61.
- ASCHER P.D. et S.J. PELOQUIN, 1966. - Effect of floral ageing on the growth of compatible and incompatible pollen tubes in *Lilium longiflorum*. *Am. J. Botan.* 53 : 99-102.
- ASCHER P.D. et L.W. DREWLOW, 1971. - Unilateral interspecific incompatibility in *Lilium*, YBK. N. am. *Lily Soc.* 24 : 70.
- ATTIA M.S., 1950. - The nature of incompatibility in cabbage. *Proc. am. Soc. Hort. Sci.* 56 : 369-371.
- ATWOOD S.S., 1944. - Oppositional alleles in natural populations of *Trifolium repens*. *Genetics* 29 : 428-435.
- ATWOOD S.S. et J.L. BREWBAKER, 1953. - Incompatibility in autopoloid white clover. *Cornell Univ. Memoir.* 319 : 1-47.
- BAHL O.P. et K.M.L. AGRAWAL, 1968. - The glycosidases of *Phaseolus vulgaris*. *J. Biol. Chem.* 243 : 98-102.
- BALASUBRAMANIAN A.S. et B.K. BACHANA, 1965. - Formation of cerebroside sulphate from 3'-phosphoadenosine 5 phosphosulfate in sheep brain. *Biochem. Biophys. Acta* 106 : 218-220.
- BANDURSKI S. et Z. PISKORNIK, 1973. - An indole 3 acetic acid ester of a cellulosic glucan in biogenesis of plant cell wall polysaccharides. LOEWUS F. ed., *Acad. Press N.Y.* : 297-314.
- BARBERA A.J., R.B. MARCHASE et S. ROTH, 1973. - Adhesive recognition and retinotectal specificity. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 70 : 2482-2486.
- BARLOW N., 1913. - Preliminary note on heterostylism in *Oxalis* and *Lythrum*. *J. Genet.* 3 : 53-65.
- BARLOW N., 1923. - Inheritance of the three forms in trimorphic species. *J. Genet.* 13 : 133-146.
- BATEMAN A.J., 1947. - Number of S-alleles in a population. *Nature* 160 : 3.
- 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 : 52-68.
- BEALE G.H., 1939. - Further studies of pollen tube competition in *Primula sinensis*. *Ann. Eugenics* 9 : 259-268.
- BENSON A.A. et B. MARUO, 1958. - Identification of the phosphatidylglycerols. *Biochim. Biophys. Acta* 27 : 189-195.
- BENSON A.A. et E.H. STRICKLAND, 1960. - Identification of diphosphatidylglycerol. *Biochem. Biophys. Acta* 44 : 328-333.

- BESANCON F. et H. ANKEL, 1974. - Binding of interferon to gangliosides. *Nature* 252 : 478-480.
- BOLWELL G.P., I.A. CALLOW, M.E. CALLOW et L.V. EVANS, 1979. - Fertilisation in brown algae. II. Evidence for lectin sensitive complimentary receptors involved in gamete recognition in *Fucus serratus*. *J. Cell. Sci.* 36 : 19-80.
- BOMSTEIN R.A., 1965. - A new class of phosphatides isolated from soft wheat flour. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 21 : 49-54.
- BOUCHILLOUX A., 1963. - Plant phenolics and their industrial significance. In : "Symposium of plant phenolic groups of North America", 1963.
- BOUHARMONT J., 1960. - Recherches cytologiques sur la fructification et l'incompatibilité chez *Theobroma cacao* L. *INEAC (Congo) Ser. Sci.* 89 : 113.
- BRADY R.O., 1973. - The abnormal biochemistry of inherited disorder of lipid metabolism. *Fed. Proc.* 32 : 1660-1667.
- BRADY R.O. et P. FISHMAN, 1974. - Biosynthesis of glycolipids in virus transformed cells. *Bioch. Biophys. Acta* 335 : 121-148.
- BREDEMEIJER G.M.M., 1976. - Effect of bud pollination and delayed self-pollination on the induction of a possible rejection peroxidase in styles of *Nicotiana glauca*. *Acta Bot. Neerl.* 25 : 107-116.
- BRETT C.T. et D.H. NORTHCOLE, 1975. - The formation of oligoglucan linked to lipid during synthesis of β glucan by characterized membrane fractions isolated from pea. *Biochem. J.* 148 : 107-117.
- BREWBAKER J.L., 1954. - Incompatibility in autotetraploid *Trifolium repens*. I. Competition and self-compatibility. *Genetics* 39 : 307-316.
- BREWBAKER J.L., 1954. - Pollen cytology and incompatibility systems in plants. *J. Hered.* 48 : 217-277.
- BREWBAKER J.L., 1958. - Self-incompatibility in tetraploid strains of *Trifolium hybridum*. *Hereditas* 44 : 547-553.
- BREWBAKER J.L., 1959. - Biology of the angiosperm pollen grain. *Ind. J. Genet. Plant Breed.* 19 : 121-133.
- BREWBAKER J.L., 1971. - Pollen enzymes and isoenzymes. In : "Pollen development and physiology. ed. HESLOP-HARRISON, London, Butterworths, 156-170.
- BREWBAKER J.L. et A.T. NATARAJAN, 1960. - Centric fragments and pollen-part mutation of incompatibility in *Petunia*. *Genetics* 45 : 699-704.
- BREWBAKER J.L. et MAJUNDER S.K., 1961. - Cultural studies of the pollen population effect and the self-incompatibility inhibition. *Am. J. Botan.* 48 : 457-464.
- BRIGGS A., 1924. - A modification of the Bell-Doisy phosphate method. *J. Biol. Chem.* 59 : 255-257.

- BRIS B., 1974. - Enzymatic activity of pollen of *Oenothera missouriensis* before and during germination *in vitro*. In : "Fertilization in higher plants, H.F. LINSKENS ed., N.H. Pub. Co.-Amsterdam.
- BRIS B. et G. LÖRCH, 1970. - Etude comparative de la respiration des styles d'*Oenothera missouriensis* après pollinisations compatible et incompatible. *Bull. Soc. Bot. Nord Fr.* 23 : 19-22.
- BRIS B. et C. DELBART, 1978. - The glycosphingolipids of the pollen and the style in *Oenothera missouriensis* Sims, self incompatible species. *Incomp. News* 8 : 74-77.
- BRIS B., C. DELBART, D. COUSTAUT et R. LINDER, 1981. - Changes in glycosphingolipids during pollination in *Oenothera missouriensis*. *Phytochem.* 20 : 1255-1258.
- BROOKS J. et G. SHAW, 1968. - Chemical structure of the exine of pollen walls and a new function for carotenoids. *Nature* 219 : 532-533.
- BROWNELL A.G., 1977. - Cell surface carbohydrates of preimplantation embryos as assessed by lectin binding. *J. of spramolecular structure* 7 : 223-234.
- BURCK W., 1901. - Preservatives on the stigma against the germination of foreign pollen. *Proc. Koninkl. Ned. Akad. Wetenschap.* 3 : 264-274.
- BURGER M.M., 1974. - The isolation of surface components involved in specific cell-cell adhesion and cellular recognition. In : Estrada-O and Gitler eds, *Perspectives in membrane biology*. Acad. Press N.Y. : 509-528.
- BURNET F.M., 1971. - "Self-recognition" in colonial marine forms and flowering plants in relation to the evolution of immunity. *Nature* 232 : 230-235.
- CALHOUN W.I. et G.G. SHIPLEY, 1979. - Fatty acids composition and thermal behavior of natural sphingomyelins. *Biochem. Biophys. Acta* 555 : 436-441
- CALLOW J.A., 1976. - Plant lectins. In : "Commentaries in Plant Science" (H. SMITH ed.) Oxf. Pergamon : 221-233.
- CARON B., 1972. - Phospholipides et glycolipides du pollen et du style chez *Oenothera missouriensis* Sims, espèce auto-incompatible. *Thèse d'Etat Pharmacie, Lille*.
- CARON B. et B. BRIS, 1972. - Caracterisation des phospholipides du pollen d'*Oenothera missouriensis* Sims. *Bull. Soc. Bot. Nord Fr.* 25 : 13-18.
- CARTER H.E., B.E. BETTS et D.R. STROBACH, 1964. - Biochemistry of the sphingolipids. XVII. The nature of the oligosaccharide component of phytoglycolipid. *Biochemistry* 3 : 1103-1107.
- CARTER H.E., D.R. STROBACH et J.N. HANTHORN, 1969. - Biochemistry of sphingolipids. XVIII. Complete structure of tetrasaccharide phytoglycolipid. *Biochemistry* 8 : 383-388.
- CLOWES A.N., R.J. CHERRY et D. CHAPMAN, 1972. - Physical effects of tetanos toxin on model membranes containing gangliosides. *J. Mol. Biol.* 67 : 49-57.

- COLES L., J.B. HAY et G.M. GRAY, 1970. - Factors affecting the glycosphingolipids composition of murine tissues. *J. Lipid. Res.* 11 : 158-163.
- COLLINS F.D., 1959. A complex phospholipid from sheep brain. *Biochem. J.* 72 : 532-537.
- CONNELL D.W., 1964. - Volatile flavouring constituents of the pineapple. *Austr. J. Chem.* 17 : 130-137.
- COPE F.W., 1939. - Studies in the mechanism of self-incompatibility in Cacao I. 8 th. Ann. Rep. *Cacao Res.* : 20-21.
- COPE F.W., 1940. - Studies in the mechanism of self-incompatibility in Cacao II. 9 th. Ann. Rep. *Cacao Res.* : 19-23.
- COPE F.W., 1958. - Incompatibility in *Theobroma cacao*. *Nature* : 181-279.
- COPE F.W., 1962. - The mechanism of pollen incompatibility in *Theobroma cacao*. *Heredity* 17 : 157-182.
- CORRENS C., 1912. - Selbsterilität and Individualstoffe *Jestschr. d. mat. nat. Gesell zur Versamml. Deut. Naturforsch. Arzte, Münster* : 1-32.
- CORRENS C., 1913. - Selbsterilität and Individualstoffe. *Biol. Centr.* 33 : 389-423.
- COUSTAUT D. et R. LINDER, 1966. - Le spectre des acides aminés dans le pollen, le style vierge, le style autopollinisé et le style xéнопollinisé chez *Oenothera missouriensis*, espèce autoincompatible. *Bull. Soc. Bot. Nord France* 3 : 159-166.
- COUSTAUT D. et R. LINDER, 1977. - Les acides gras du pollen et des styles dans *Oenothera missouriensis* Sims, espèce autoincompatible. *C.R. Acad. Sci. D*, 284 : 1071-1075.
- CRANDALL M., C.M. LAWRENCE et R.M. SAUNDERS, 1974. - Molecular complementarity of yeast glycoproteins mating factors. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 71 : 26-29.
- CRANE M.B. et A.G. BROWN, 1937. - Incompatibility and sterility in the sweet cherry *Prunus avium*. *L.J. Pomol.* 15 : 86-116.
- CRANE M.B. et N.J.C. LAWRENCE, 1952. - The genetics of garden plants (5th ed.) Mc Millan, London : 301.
- CRITCHLEY D.R. et M.G. VICKER, 1977. - Glycolipids as membrane receptors important in growth regulation and cell-cell interactions. *Dynamic aspects of cell surface organization cell surface reviews* 3 : 745.
- CROWE L.K., 1954. - Incompatibility in *Cosmos bipinnatus*. *Heredity* 8 : 1-11.
- CROWE L.K., 1971. - The polygenic control of out breeding in *Borago officinalis*. *Heredity* 27 : 111-118.
- CUATRECASAS P., 1973. - Gangliosides and membrane receptor for cholera toxin. *Biochemistry* 12 : 3558-3566.

- CUMAR F.A., H.S. BARRA, H.J. MACCIONI et R. CAPUTTO, 1968. - Sulfatation of GSL and related carbohydrate by brain preparations from young rats. *J. Biol. Chem.* 243 : 3807-3816.
- CURTIS A.S.G. et O. HILL, 1979. - Cell surface lipids and adhesion. IV. The effects of trypsin on lipids turnover by the plasmalemma. *J. Cell. Sci.* 38 : 283-292.
- DARWIN C., 1876. - The effects of cross and self fertilization in the vegetable kingdom. 2nd ed., 1878, N.Y. D. APPLETON.
- DARWIN C., 1877. - The different forms of flowers on plants of the same species. London. J. MURRAY.
- DAVIS M.T. et D.F. SILBERT, 1974. - Changes in cell permeability following a marked reduction of saturated fatty acid content of *E. coli* K 12. *Biochem. Biophys. Acta* 373 : 224-241.
- DAWSON R.M.C., N. CLARKE et R.H. QUARLES, 1969. - N-acyl-phosphatidyléthanamine, a phospholipid that is rapidly metabolized during the early germination of Pea seeds. *Biochem. J.* 114 : 265-270.
- DEARBORN D.G., G. SMITH et E.D. KORN, 1976. - Lipophosphono glycan of the plasma membrane of *Acanthamoeba castellanii*. Inositol and phytosphingosine content and general structural features. *J. Biol. Chem.* 251 : 2976-2984.
- DEBUCH H. et E. ROTSCHE, 1966. - In : "Z. Physiol. Chem." 346 : 79-86.
- Van DEENEN L.L.M., J. de GIER, R.A. DEMEL et B. de KRUYFF, 1975. - Lipid-Lipid and lipid protein interaction in model systems and membranes *Annals of the N.Y. Academy of Sciences* 264 : 124-141.
- DELBART C., 1978. - Evolution des glycosphingolipides chez *Petunia hybrida*, espèce autoincompatible, après pollinisation. Thèse 3ème Cycle.
- DENWARD T., 1963. - The function of the incompatibility alleles in red clover (*Trifolium pratense* L.). *Hereditas* 49 : 189-334.
- DESBOROUGH S. et S.J. PELOQUIN, 1968. - Disc-electrophoresis of proteins and enzymes from styles, pollen tubes of self-incompatible cultivars of *Lilium longiflorum*. *Theoret. Appl. Genetics* 38 : 327-331.
- DEVAUX P. et H.M. Mc CONNEL, 1973. - Equality of the rates of lateral diffusion of phosphatidyl ethanolamine and phosphatidylcholine spin labels in rabbit sarcoplasmic reticulum. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 222 : 489-498.
- DEVREUX M., U. LANERI, E. MAGNIEN et M.R. CELESTRE, 1975. - Biological screening method for mutated pollen at the S-locus by *in vitro* culture of pollinated pistil. *Incomp. Newslett.* 5 : 17-18.
- DICKINSON H.G., 1967. - Permeability and respiratory properties of germinating pollen. *Physiol. Plant.* 20 : 118-127.
- DICKINSON H.G. et D. LEWIS, 1973. - The formation of the tryphine coating the pollen grains of *Raphanus*, and its properties relating to the self-incompatibility system. *Proc. Roy. Soc. London, Series B.* 184 : 148-165.

- DICKINSON H.G. et J. LAWSON, 1975. - Pollen tube growth in the stigma of *Oenothera organensis* following compatible and incompatible intraspecific pollinations. *Proc. Roy. Soc. London, Series B* 188 : 327-344.
- DICKINSON H.G. et D. LEWIS, 1974. - Changes in the pollen grain wall of *Linum grandiflorum* following compatible and incompatible intraspecific pollinations. *Ann. Bot.* 38 : 23-29.
- DICKINSON H.G. et D. LEWIS, 1975. - Interactions between the pollen grain coating and the stigmatic surface during compatible and incompatible interspecific pollinations in *Raphanus*. *Biol. J. Linneum Soc.*, 7 : 165-175.
- DONK J.A.W. vander, 1975. - Translation of plant messengers in egg cells of *Xenopus laevis*. *Nature* 256 : 674-675.
- DONK J.A.W. vander, 1975. - Recognition and gene expression during the incompatibility reaction in *Petunia hybrida* L. *Molec. Gen. Genet.* 141 : 305-316.
- DORNER F., M. SCRIBA et R. WEIL, 1973. - Interferon : evidence for its glycoprotein nature. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 70 : 1981-1985.
- DOUCE R., 1970. - Le diphosphatidylglycérol des végétaux supérieurs : structure, localisation, métabolisme. *Thèse, Paris*.
- DOWRICK V.P.J., 1956. - Heterostyly and homostyly in *Primula obconica*. *Heredity* 10 : 219-236.
- DUTTERA S.M., W.L. BYRNE et M.C. GANOZA, 1966. - Studies on the phospholipid requirement of glucose 6 phosphatase. *J. Biol. Chem.* 243 : 2216-2228.
- EAST E.M., 1926. - The physiology of self-sterility in plants. *Jacques Loeb Mem. vol. J. Gen. Physiol.* 8 : 403-416.
- EAST E.M., 1929. - Self-sterility. *Bibliographica Genetica* 5 : 331-370.
- EAST E.M., 1934. - Norms of pollen tube growth in incompatible matings of self-sterile plants. *Proc. Nat. Acad. Sci. (Wash.)* 20 : 225-230.
- EAST E.M., 1940. - The distribution of self sterility in flowering plants. *Proc. ann. Phil. Soc.* 82 : 449-518.
- EAST E.M. et J.R. PARK, 1917. - Studies on self sterility. I. The behavior of self sterile plants. *Genetics* 2 : 505-609.
- EAST E.M. et A.J. MANGELSDORF, 1925. - A new interpretation of the hereditary behavior of self sterile plants. *Proc. Nat. Acad. Sci. (Wash.)* 11 : 166-171.
- EMERSON S., 1939. - A preliminary survey of the *Oenothera organensis* population. *Genetics* 24 : 524-537.
- ERNST A., 1936. - Heterostyle-Forschung Versuche zur genetischen Analyse eines Organisations und Anpassung smerkales. *Z. indukt. Abstamm. Vererbl.* 71 : 156-230.

- ESSER K. et R. KUENEN, 1967. - In : "Genetics of fungi. Springer-Verlag Berl. Heidelberg N.Y. : 54-84.
- FATHIPOUR A., K.K. SCHLENDER et H.M. SELL, 1967. - The occurrence of fatty acids methylesters in the pollen of *Zea mays*. *Biochem. Biophys. Acta* 144 : 476-483.
- FERRARI T.E. et D.H. WALLACE, 1977. - A model for self recognition and regulation of the incompatibility response in pollen. *Theor. appl. Genetics* 50 : 211-225.
- FILZER H., 1926. - Die Selbsterilität von *Veronica syriaca*. *Z. indukt Abstamm. Vererb.* 41 : 137-140.
- FINDLAY J., G.A. LEVY et C.A. MARSH, 1958. - Inhibition of glycosidase by aldonolactones of corresponding configuration. *Biochem. J.* 69 : 467.
- FISCHER R.A. et K. MATHER, 1943. - The inheritance of style length in *Lythrum salicaria*. *Ann. eugen.* 12 : 1-11.
- FISHMAN P.H., J. MOSS, R.L. RICHARDS, R.O. BRADY et C.R. ALVING, 1979. - Liposomes as model membranes for ligand-receptor interactions : studies with cholera toxin and glycolipids. *Biochemistry* 18 : 2562-2566.
- FISCHER R.A. et K. MATHER, 1943. - The inheritance of style length in *Lythrum salicaria*. *Ann. eugen.* 12 : 1-11.
- FOLCH J., M. LEES et G.H. SLOANE STANLEY, 1957. - A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem.*, 226 : 497-501.
- GACTO M. et S. STEINER, 1976. - Fucolipid metabolism as a function of cell population density in normal and murine sarcoma virus transformed rat cells. *Biochem. Biophys. Acta* 444 : 11-23.
- GAGNIEU A., 1950. - L'incompatibilité chez les plantes supérieures : Problème de génétique végétale. *Ann. Biol.* 26 : 3-4.
- GAHMBERG C.G. et S. HAKOMORI, 1975. - Surface carbohydrates of hamster fibroblasts. I. Chemical characterization of surface labelled glycosphingolipids and a ceramide tetrasaccharide specific for transformants. *J. Biol. Chem.* 250 : 2438-2446.
- GALANOS D.S. et V.M. KAPOULAS, 1965. - Preparation and analysis of lipid extracts from milk and other tissues. *Biochem. Biophys. Acta* 98 : 278-292.
- GASTEL A.J.G. van, 1972. - Spontaneous stylar part mutations in *Nicotiana glauca* Link and Otto. *Incomp. Newsl. Assoc. Euratom-Ital, Wageningen* 1 : 12-13.
- GASTEL A.J.G. van et J. CARLUCCIO, 1974. - The radiogenetics of self-incompatibility. *Ann. Report Comm. Europ. Comm. Progr. Biol. Health Protection.*

- GASTEL A.J.G. van et D. NETTANCOURT, 1974. - The effects of different mutagens on self-incompatibility in *Nicotiana glauca* Link and Otto. I. Chronic gamma irradiation. *Radiation Botan.* 14 : 43-50.
- GERSTEL D.U., 1950. - Self-incompatibility studies in Guayule. II. Inheritance. *Genetics* 35 : 482-506.
- GIER de J. et L.L.M. Van DEENEN, 1961. - Some lipid characteristics of red cell membranes of various animal tissues. *Biochim. Biophys. Acta* 49 : 286-296.
- GIER de J., J.G. MANDERSLOOT et L.L.M. Van DEENEN, 1968. - Lipid composition and permeability of liposomes. *Biochim. Biophys. Acta* 150 : 666-675.
- GIER de J., P.C. NOORDAM, C.A.J. Van ECHELD, J.G. MANDERSLOOT, M. BIJLEVELD, J. VERKLEIJ, P.R. CULLIS et B. de KRULL, 1980. - The barrier function of membrane lipids. In : "Membrane transport in erythrocyte. M. BENZON Symposium 14. Ed. U.V. LASSEN, H.H. USSING et J.O. WIETH, Munksgaard, Copenhagen.
- GRAF L. et P. RAPPORT, 1974. - Serological activity of GSL. *Chem. Phys. of Lipids* 13 : 367.
- GRANT V., 1949. - Pollination systems as isolating mechanisms in Angiosperms. *Evolution* 3 : 82-97.
- GRAY G.M., 1974. - Glycosphingolipids in biological membranes in perspectives in membrane biology. ESTRADA et GITLER ed. *Acad. Press N.Y.* : 85-106.
- GRIMES W.J., G.A. Van NEST et A.R. KAMM, 1977. - Chemical and immunological sites of cell surfaces from normal and transformed cells. *J. of supramolecular structure* 6 : 449-464.
- Mc GUIRE E.J. et C.L. BURDICK, 1975. - Intercellular adhesive selectivity. I. An improved assay for the measurement of embryonic chick intercellular adhesion (liver and other tissues). *J. Cell Biol.* 68 : 80-89.
- HAKOMORI S., 1970. - Glycosphingolipids having blood group ABH and Lewis specificities. *Chem. Phys. Lipids* 5 : 96-115.
- HAKOMORI S., 1975. - Fucolipids and blood group glycolipids in normal and tumor tissue. *Progr. Biochem. Pharmacol.* 10 : 167-196.
- HAKOMORI S. et R.W. JEANLOZ, 1964. - Isolation of a glycolipid containing fuc, gal, Glc and Glc NH₂ from human cancerous tissue. *J. Biol. Chem.* 239 : 3606-3607.
- HAKOMORI S. et W.I. MURAHAMI, 1968. - Glycolipids of hamster fibroblasts and derived malignant transformed cell lines. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 59 : 254-261.
- HAKOMORI S. et S. KIJIMOTO, 1972. - Forssman reactivity and cell contact in cultural hamster cells. *Nature* 239 : 87-88.

- HAMERS M.A., W.E. DONKER-KOOPMAN, M.J. COULON-MORELEC, P. DUPOVEY et J.M. TAGER, 1978. - Characterization of antibodies against ceramidetrihexoside and globo-side. *Immunochemistry* 15 : 353-359.
- HASLAM J.H., T.N. STITHILL, A.N. LINNANE et J.R. CHAPPELL, 1973. - The effects of altered membrane lipid composition on cation transport by mitochondria of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem. J.* 134 : 949-957.
- HAVEZ R., 1967. - Les aspects biochimiques des barrières d'incompatibilité de fécondation. Colloque CNRS - RCP 115 "Analyse des mécanismes génétiques qui limitent la fertilité chez les plantes". Strasbourg.
- HAYWOOD A.M., 1974. - Characteristics of Sendai virus receptors in a model membrane. *J. Mol. Biol.* 83 : 427-436.
- HECHT A., 1960. - Growth of pollen tubes of *Oenothera organensis* through otherwise incompatible styles. *Am. J. Bot.* 47 : 32-36.
- HECHT A., 1964. - Partial inactivation of an incompatibility substance in the stigmas and styles of *Oenothera*. In : "Pollen physiology and fertilization". Ed. H.F. LINSKENS, Amst. N.H. : 237-243.
- HEITZ B., 1972. - L'hétérostylie chez les lins du groupe *Linum perenne*. Thèse Doctorat Strasbourg.
- HENNY R.J. et P.D. ASCHER, 1973. - Effect of auxin on *in vivo* compatible and incompatible pollen growth in detached style of *Lilium longiflorum* Thunb. *Incomp. Newsl.* 3 : 14-17.
- HESLOP-HARRISON J., 1967. - Ribosome sites and S gene action. *Nature (Lond.)* 218 : 90-91.
- HESLOP-HARRISON J., 1968. - Tapetal origin of pollen coat substances in *Lilium*. *New Phytol.* 67 : 779-788.
- HESLOP-HARRISON J., 1968. - Pollen wall development. *Science* 161 : 230-237.
- HESLOP-HARRISON J., 1971. - Pollen : development and physiology. Butterworths London.
- HESLOP-HARRISON J., 1975a. - Incompatibility and the pollen stigma interaction. *Ann. Rev. Plant physiol.* 26 : 403-425.
- HESLOP-HARRISON J., 1975b. - Male gametophyte selection and the pollen stigma interaction. In : "Gamete competition in plants and animals". Ed. B.L. MULCAHY, Villa Carlotta, N.H. Pub. Co. Amst. Oxf. : 177-190.
- HESLOP-HARRISON J., Y. HESLOP-HARRISON, R.B. KNOX et B.J. HOWLETT, 1973. - Pollen wall proteins : "gametophytic" and "sporophytic" fraction in the pollen wall of the *Malvaceae*. *Ann. Bot.* 37 : 403-412.
- HESLOP-HARRISON J., R.B. KNOX et Y. HESLOP-HARRISON, 1974. - Pollen wall proteins : exine held fractions associated with the incompatibility response in *Cruciferae*. *Theoret. Appl. Genet.* 44 : 133-137.

- HESLOP-HARRISON J., R.B. KNOX, Y. HESLOP-HARRISON et O. MATTSON, 1975. - Pollen wall proteins : emission and role in incompatibility responses. In : "Biology of the male gamete". Ed. J.G. DUCKETT, P.A. RACEY. *Biol. J. Linnean Soc. Suppl.* 1, VII : 189-202.
- HESLOP-HARRISON J. et J. BARBER, 1975. - The stigma surface in incompatibility responses. *Proc. R. Soc.* 188 : 287-299.
- HESLOP-HARRISON J. et Y. HESLOP-HARRISON, 1975. - Enzymic removal of proteinaceous pellicle of the stigma papilla prevents pollen tube entry in the *Caryophyllaceae*. *Ann. Bot.* 39 : 163-165.
- HIGGINS T., A. SABATINO, H. REMOLD et J. DAVID, 1976. - Enhancement of migration inhibitory factor activity by preincubations macrophages with macrophage glycolipids. *Fed. Proc.* 35 Abstr. 1015 : 389.
- HITCHCOCK C., 1975. - Structure and distribution of plant acyl lipids. In : "Proceedings 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 B.W. NICHOLS, 1975. - Plant lipid chemistry. *Acad. Press*.
- HODGON A.L. et A. HECHT, 1975. - The effect of p. chloromercuri - benzoate on the incompatibility mechanism in excised stigma-styles of *Oenothera organensis*. *Incomp. Newslett. Assoc. EURATOM. ITAL, Wageningen* 5 : 29-31.
- HOFFMANN M., 1966. - Bestimmung der Selbstinkompatibilitätsallele und Inkompatibilitätsreaktion bei *Lycopersicum peruvianum* (L.). *Mhll.*, unpublished. *Diplomarb. Greifswald*.
- HOGENBOOM N.G., 1972. - Breaking breeding barriers in *Lycopersicon*. 2. Breakdown of self-incompatibility in *L. peruvianum* (L.) Mill. *Euphytica* 21 : 228-243.
- HOLLENBERG M.D., P.H. FISHMAN, V. BENNETT et P. CUASTRE CASAS, 1974. - Cholera toxin and cell growth. Role of membrane gangliosides. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 71 : 4224-4228.
- HOLMGREN J., 1979. - Comparison of the tissue receptors of *Vibrio cholerae* and *E. coli* enterotoxins by means of ganglioside and natural cholera toxoid. *Infect. Immun.* 8 : 851-859.
- HOPPER J.E. et S.J. PELOQUIN, 1968. - X-ray inactivation of the stylar component of the self-incompatibility reaction in *Lilium longiflorum*. *Can. J. Genet. Cytol.* 10 : 941-944.
- HOWE C.N.S. et C.B. METZ, 1973. - The use of divalent and monovalent concanavalin A as probes of sperm egg interactions. *Biol. Bull.* : 143-465.
- HOWLETT B.J., R.B. KNOX et J. HESLOP-HARRISON, 1973. - Pollen wall proteins : release of the allergen antigen E from intine and exine sites in pollen grains of ragweed and cosmos. *J. Cell. Sci.* 13 : 603-619.

- HOWLETT B.J., R.B. KNOX, J.D. PAXTON et J. HESLOP-HARRISON, 1975. - Pollen wall proteins : physicochemical characterization and role in self-incompatibility in *Cosmos bipinnatus*. *Proc. Roy. Soc.* 188 : 167-182.
- HSIANG T.T., 1951. - Physiological and biochemical changes accompanying pollination in orchid flowers. II. Respiration, catalase activity and chemical constituents. *Plant Physiol.* 26 : 708-721.
- HUGHES M.B. et E.B. BABCOCK, 1950. - Self-incompatibility in *Crepis foetida* L. subsp. *rhoedaifolia*. *Genetics* 35 : 570-588.
- JACOB F. et J. MONOD, 1961. - Genetic regulatory mechanisms in the synthesis of proteins. *J. Mol. Biol.* 3 : 318-356.
- JOLLIOT A. et P. MAZLIAK, 1973. - Rôle des lipides dans diverses activités enzymatiques de la chaîne de transport des électrons d'une fraction mitochondriale isolée d'inflorescence de chou fleur. *Plant. Sci. Lett.* 1 : 21-29.
- JONES P.D. et S.J. WAKIL, 1967. - A requirement for phospholipids by the microsomal reduced diphosphopyridine-nucleotide cytochrome c reductase. *J. Biol. Chem.* 242 : 5267-5273.
- KAKIZAKI Y., 1930. - Studies on the genetics and physiology of self and cross-incompatibility in the common cabbage. *Jap. J. Botan.* 5 : 133-208.
- KANNO T. et K. HINAKA, 1969. - An electron microscopic study of the barrier against pollen tube growth in self incompatible *Cruciferae*. *Plant cell physiol. Tokyo* 10 : 213-216.
- KANTA K., N.S. RANGASWAMY et P. MAHESHWARI, 1962. - Test-tube fertilization in a flowering plant. *Nature (Lond.)* 194 : 1214-1217.
- KARLSSON K.A., 1965. - Studies on sphingosines. Use of TMS others for the gas chromatography and MS of sphingosines. *Acta Chem. Scand.* 19 : 2425-2427.
- KARLSSON K.A., 1968. - Enzymatic hydrolysis of sphingomyelins : use in structure analysis. *Acta Chem. Scand.* 22 : 3050-3052.
- KARLSSON K.A., 1970. - On the chemistry and occurrence of sphingolipid long chain bases. *Chem. Phys. Lipids* 5 : 6-43.
- KARLSSON K.A., 1971. - Sphingolipid long chain bases. *Lipids* 5 : 878 : 891.
- KARLSSON K.A., B.E. SAMUELSSON et G.O. STEEN, 1973. - Detailed structure of sphingomyelins and ceramides from different regions of bovines kidney with special reference to long chaine base. *Biochem. Biophys. Acta* 316 : 336-362.
- KENDALL W.A. et N.L. TAYLOR, 1969. - Effects of temperature on pseudo-self compatibility in *Trifolium pratense* L. *Theoret. Appl. Genet.* 39 : 123-126.

- KHAVKIN E.E., S.I. MISHARIN, V.N. IVANOV et K.N. DANOVICH, 1977. - Embryonal antigens in maize caryopses. *Planta* 135 : 225-231.
- KING T.P., P.S. NORMAN et J.T. CONNELL, 1964. - Isolation and characterization of allergens from ragweed pollen II. *Biochemistry* 3 : 458-468.
- KIVILAAN A. et C.W. CHANG, 1963. - Effect of grafting on the incompatibility response of *Oenothera organiensis*. *Nature (Lond.)* 197 : 1130-1131.
- KNIGHT R. et H.H. ROGERS, 1953. - Sterility in *Theobroma cacao* L. *Nature (Lond.)* 172 : 164.
- KNIGHT R. et H.H. ROGERS, 1955. - Incompatibility in *Theobroma cacao*. *Heredity* 9 : 69-77.
- KNOX R.B., 1971. - Pollen wall proteins : localization, enzymic and antigenic activity during development in *Gladiolus*. *J. Cell. Sci.* 9 : 209-237.
- KNOX R.B., 1973. - Pollen wall proteins : pollen stigma interactions in ragweed and cosmos (*Compositae*). *J. Cell. Sci.* 12 : 421-443.
- KNOX R.B. et J. HESLOP-HARRISON, 1969. - Cytochemical localization of enzymes in the wall of the pollen grain. *Nature (Lond.)* 223 : 92-94.
- KNOX R.B. et J. HESLOP-HARRISON, 1970. - Pollen wall proteins : localization and enzymic activity. *J. Cell. Sci.* 6 : 1-27.
- KNOX R.B., J. HESLOP-HARRISON et C.E. REED, 1970. - Localization of antigens associated with the pollen grain wall by immunofluorescence. *Nature (Lond.)* 225 : 1066-1068.
- KNOX R.B. et J. HESLOP-HARRISON, 1971. - Pollen wall proteins : localization of antigenic and allergenic proteins in the pollen-grain walls of *Ambrosia* spp. *Cytobios* 4 : 49-54.
- KNOX R.B. et J. HESLOP-HARRISON, 1971. - Intine-held antigens on the stigma of *Phalaris*. *J. Cell. Sci.* 9 : 239-251.
- KNOX R.B., R. WILLING et A.E. ASHFORD, 1972. - Role of pollen wall proteins as recognition substances in interspecific incompatibility in poplars. *Nature (Lond.)* 237 : 381-383.
- KNOX R.B., J. HESLOP-HARRISON et Y. HESLOP-HARRISON, 1975. - Pollen wall proteins : localization and characterization of gametophytic and sporophytic fractions. In : "The biology of the male gamete". Ed. J.G. DUCKETT. *Acad. Press Lond.* : 177-187.
- KNOX R.R., A. CLARKE, P. SMITH, J.J. MARCHALONIS, 1976. - Cell recognition in plants : determinants of the stigma surface and their pollen interactions. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 73 : 2788-2792.
- KÖLREUTER J.G., 1764. - Vorläufige Nachricht von einigen das Geschlecht der Pflanzen betreffenden Versuchen und Beobachtungen, nebst Fortsetzungen. 1,2 U.3, p. 266, Ostwald's Klassiker, 41, Leipzig : Engelmann.

- KONAR R.R. et H.F. LINSKENS, 1966. - Chemistry of the stigmatic fluid of *Petunia hybrida*. *Planta* 71 : 372-387.
- KROES H.W., 1973. - An enzyme theory of self-incompatibility. *Incomp. Newslet. assoc. EURATOM-ITAL, Wageningen* 2 : 5-14.
- KROH M., 1964. - An electron microscopic study of the behavior of *Cruciferae* pollen after pollination. In : "Pollen physiology and fertilization". Ed. H.F. LINSKENS, Amst. N.H. : 221-224.
- KROH M., 1967. - Germination du pollen et croissance du tube pollinique chez les Crucifères. *Colloque CNRS, RCP 115 : Physiologie et Biochimie du tube pollinique incompatible* : 16-17.
- KROH M. et A.J. MUNTING, 1967. - Pollen-germination and pollen tube growth in *Diploaxis tenuifolia* after cross-pollination. *Acta Bot. Neerl.* 16 : 182-187.
- KROTKOV G., 1939. - Carbohydrate and respiratory metabolism in the isolated starving leaf of wheat. *Plant Physiol.* 14 : 203-226.
- KUIPER P.J.C., 1975. - Role of lipids in water and ion transport. In : "Recent advances in the chemistry and biochemistry of plant lipids". Galliard et Mercer eds. *Acad. Press* : 360-386.
- LABARCA C., M. KROH et F. LOEWUS, 1970. - The composition of stigmatic exudate from *Lilium longiflorum*. *Plant physiol.* 46 : 150-156.
- LANIEZ D., 1969. - Glycoprotéines et glycannes-hydrolases au cours de la pollinisation chez *Petunia hybrida* autoincompatible. *Thèse Doctorat, Pharmacie, Lille*.
- LAUF P.K., 1975. - Antigen-antibody reaction and cation transport in biomembranes : immunophysiological aspects. *Biochem. Biophys. Acta* 415 : 173-229.
- LAVIER W.G. et R.G. WEBSTER, 1966. - The structure of influenza viruses. IV. Chemical studies of the host antigen. *Virology* 30 : 104-115.
- LEDEEN R., 1978. - Ganglioside structures and distribution : are they localized at the nerve ending ? *J. supramol. struct.* 8 : 1-17.
- LEFFEL R.C., 1963. - Pseudo-self-compatibility and segregation of gametophytic self-incompatibility alleles in red clover *Trifolium pratense* L. *Crop. Sci.* 3 : 377-380.
- LESTER R.L., S.N. SMITH, G.B. WELLS, D.G. REES et W.W. ANGUS, 1974. - The isolation and partial characterization of 2 novel sphingolipids from *Neurospora crassa* (inositol-P) 2-ceramide and (gal)₃-glu-ceramide. *J. Biol. Chem.* 249 : 3388-3394.

- LEWIS D., 1942. - The physiology of incompatibility in plants. I. The effect of temperature. *Proc. Roy. Soc. London, Series B*, 131 : 13.
- LEWIS D., 1943. - The physiology of incompatibility in plants. II. *Linum grandiflorum*. *Ann. Botan.* 11, 7 : 115-122.
- LEWIS D., 1947. - Competition and dominance of incompatibility alleles in diploid pollen. *Heredity* 1 : 85-108.
- LEWIS D., 1949. - Incompatibility in flowering plants. *Biol. Rev.* 24 : 472-496.
- LEWIS D., 1949. - Structure of the incompatibility gene. II. Induced mutation rate. *Heredity* 3 : 339-355.
- LEWIS D., 1951. - Structure of the incompatibility gene. III. Types of spontaneous and induced mutation. *Heredity* 5 : 399-414.
- LEWIS D., 1952. - Serological reactions of pollen incompatibility substances. *Proc. Roy. Soc. London, Series B*, 140 : 127-135.
- LEWIS D., 1954. - Comparative incompatibility in angiosperms and fungi. *Advanc. Genet.* 6 : 235-285.
- LEWIS D., 1960. - Genetic control of specificity and activity of the S antigen in plants. *Proc. Roy. Soc. London, Series B*, 151 : 468-477.
- LEWIS D., 1965. - A protein dimer hypothesis on incompatibility. *Genetics to day Geerts (ed.)*, 3 : 657-663.
- LEWIS D. et L.K. CROWE, 1954. - Structure of the incompatibility gene. IV. Types of mutation in *Prunus avium* L. *Heredity* 8 : 357-363.
- LEWIS D., S. BURRACE et D. WALL, 1967. - Immunological reactions of single pollen grains, electrophoresis and enzymology of pollen proteins exudates. *J. Exp. Bot.* 18 : 371-378.
- LINDER R., 1952. - L'incompatibilité dans *Oenothera missouriensis* Sims. *Ann. amel. plantes* 2 : 189-213.
- LINDER R., 1954. - Etude génétique des mécanismes qui limitent la fertilité dans *Oenothera missouriensis* et *Oenothera fruticosa*. Thèse Doctorat d'Etat, Strasbourg.
- LINDER R., 1954. - Etude génétique des mécanismes qui limitent la fertilité dans *Oenothera missouriensis* et *Oenothera fruticosa*. *Ann. Biol.* 11-12 : 501-505.
- LINDER R., 1967. - Aspects du déterminisme génétique de l'incompatibilité. *Colloque interne du CNRS. RCP 115, Strasbourg* : 3-6.
- LINDER R. et J. DELAY, 1969. - Vitesse de croissance du tube pollinique chez *Oenothera missouriensis* Sims, espèce auto-incompatible. *Bull. Soc. Bot. Nord France* 22 : 15-17.

- LINDER R. et H.F. LINSKENS, 1972. - Evolution des acides aminés dans le style d'*Oenothera missouriensis* vierge, autopollinisé et xéнопollinisé. *Theor. appl. gen.* 42 : 125-129.
- LINSKENS H.F., 1953. - Physiologische und chemische Unterschiede zwischen selbst und fremdbestäubten Petunien Griffeln. *Naturwiss.* 40 : 28.
- LINSKENS H.F., 1955. - Physiologische Untersuchungen der Pollenschlauch-Hemmung selbsteriler Petunien. *Z. Bot.* 43 : 1-44.
- LINSKENS H.F., 1961. - Biochemical aspects of incompatibility. *Rec. Adv. Bot.* 13 : 1500-1503.
- LINSKENS H.F., 1964. - The influence of castration on pollen tube growth after self-pollination. In : "Pollen physiology and fertilization". Ed. H.F. LINSKENS, Amsterdam, North Holland : 230-236.
- LINSKENS H.F., 1965. - Pollen physiology. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 15 : 255-270.
- LINSKENS H.F., 1965. - Biochemistry of incompatibility. *Proc. 11 th. Intern. Cong. Genet. The Hague, 1963.* In : "Genetics today", Ed. S.J. GEERTS, 3 : 621-636.
- LINSKENS H.F., 1967. - Pollen. In : "Encyclopedia of plant physiology". Ed. W. RUHLAND, Berlin-Göttingen-Heidelberg, Springer XXVIII.
- LINSKENS H.F., 1972. - The reaction of inhibition during incompatible pollination and its elimination. *Sovjet plant physiol.* 20 : 156-166.
- LINSKENS H.F., 1974. - Some observations on the growth of the styles. *Incomp. Newsletter* 4 : 4-15.
- LINSKENS H.F., 1975. - Incompatibility in *Petunia*. *Proc. Roy. Soc. London, Series B*, 188 : 299-311.
- LINSKENS H.F. et K.L. ESSER, 1957. - Über eine spezifische Anfärbung der Pollenschläuche im Griffel und die Zahl der kallosepfropfen nach Selbstdung und Fremddung. *Naturwissensch.* 44 : 1-2.
- LINSKENS H.F., J.A. SCHRAUWENS et M. VAN DER DONK, 1960. - Überwindung der Selbstinkompatibilität durch Röntgenbestrahlung des Griffels. *Naturwissensch.* 46 : 547.
- LINSKENS H.F. et W. HEINEN, 1962. - Cutinase-Nachweis in Pollen. *Z. Botan.* 50 : 338-347.
- LINSKENS H.F. et J.A. SCHRAUWEN, 1966. - Measurement of oxygen tension changes in the style during pollen tube growth. *Planta* 71 : 98-106.
- LINSKENS H.F. et J. TUPY, 1966. - The aminoacids pool in the style of self-incompatible strains of *Petunia* after self and cross pollination. *Der Zücht.* 36 Band Heft 4 : 151-158.

- LINSKENS H.F. et M. KROH, 1967. - Inkompatibilität der Phanerogamen. In : "Encyclopedia of plant physiology". Ed. W. RUHLAND, Berlin-Heidelberg, New-York, Springer 1967 : 506-530.
- LINSKENS H.F., R. HAVEZ, R. LINDER, M. SALDEN, A. RANDOUX, D. LANIEZ et D. COUSTAUT, 1969. - Etude des glycanne-hydrolases au cours de la croissance du pollen chez *Petunia hybrida* auto-incompatible. C.R. Acad. Sci. (Paris) 269 : 1855-1857.
- LINSKENS H.F. et A.W. SPANJERS, 1973. - Changes in the electrical potential in the transmitting tissue of *Petunia* styles after cross- and self-pollination. *Incomp. Newslett. Assoc. EURATOM-ITAL, Wageningen* 3 : 81-85.
- LIS (H.) et N. SHARON, 1973. - The biochemistry of plant lectins (phytohemagglutinins). *Ann. Rev. Biochem.* 42 : 541-574.
- LOOMIS W.D. et J. BATTAILLE, 1966. - Phenolic compounds of plants and the isolation of enzymes. *Phytochem.* 5 : 423-443.
- LOPRIORE G., 1928. - Die Katalase-Reaktion und die Biologie des Pollens. *Ber. Deut. Botan. Ges.* 46 : 413-423.
- LUDERITZ O., A.M. STAUB et O. WESTPHAL, 1966. - Immunochemistry of O and R antigens of *Salmonella* and related *Enterobacteriaceae*. *Bact. Rev.* 30 : 192.
- LUNDQVIST A., 1956. - Self-incompatibility in rye. I. Genetic control in the diploid. *Hereditas* 42 : 293-348.
- LUNDQVIST A., 1961. - A rapid method for the analysis of incompatibilities in grasses. *Hereditas* 47 : 705-707.
- LUNDQVIST A., 1962. - The nature of the two loci incompatibility system in grasses. I. The hypothesis of a duplicative origin. *Hereditas* 48 : 153-168.
- LUNDQVIST A., 1964. - The nature of the two-loci incompatibility system in grasses. IV. Interaction between the loci in relation to pseudo-compatibility in *Festuca pratensis* Huds. *Hereditas* 52 : 221-234.
- LUNDQVIST A., 1965. - The genetics of incompatibility. *Proc 11th intern. Cong. Genet. The Hague, 1963* ; In : "Genetics to day". Ed. S.J. GEERTS, 3 : 637-647.
- LUNDQVIST A., 1968. - The mode of origin of self-fertility in grasses. *Hereditas* 59 : 413-426.
- LUNDQVIST A., U. ØSTERBYE, K. LARSEN et J. LINDE-LAURSEN, 1963. - Complex self-incompatibility systems in *Ranunculus acris* L. and *Beta vulgaris* L. *Hereditas* 74 : 161-168.

- MAHESHWARI P. et K. KANTA, 1964. - Control of fertilization. In : "Pollen Physiology and fertilization". Ed. H.F. LINSKENS, Amsterdam, North Holland : 187-194.
- MÄKINEN Y.L.A. et D. LEWIS, 1962. - Immunological analysis of incompatibility (S) proteins and of cross reacting material in a self-compatible mutant of *Oenothera orgonensis*. *Genet. Res.* 3 : 352-363.
- MÄKINEN Y.L.A. et J.L. BREWBAKER, 1967. - Isoenzyme polymorphism in flowering plants. I. Diffusion of enzymes out of intact pollen grains. *Physiol. Plantarum* 20 : 477-482.
- MARSHALL N.J. et R.P. Von BOREKIS-EAKINS, 1976. - Independence of β adrenergic and thyrotropin receptors linked to adenylate cyclase in thyroid. *Nature* 261 : 603-604.
- MARTENSON E., 1969. - Glycosphingolipids of animal tissue. *Progr. Chem. Fats other lipids* 10 : 365-407.
- MARTIN F.W., 1958. - Staining and observing pollen tubes in the style by means of fluorescence. *Stain Tech.* 34 : 125-128.
- MARTIN F.W., 1973. - Fertility, incompatibility and morphological abnormalities of sweet potato imbeds. *Incomp. Newslett Assoc. EURATOM-ITAL, Wageningen* 2 : 29-31.
- MASON H.S., 1955. - Reactions between quinones and proteins. *Nature* 175 : 771-772.
- MATHER K., 1943. - Specific differences in *Petunia*. I. Incompatibility. *J. Genet.* 45 : 215-235.
- MATHER K., 1950. - The genetical architecture of heterostyly in *Primula sinensis*. *Evolution* 4 : 340-352.
- MATTSSON O., R.B. KNOX, J. et Y. HESLOP-HARRISON, 1974. - Protein pellicle of stigmatic papillae as a probable recognition site in incompatibility reactions. *Nature (Lond.)* 247 : 298-300.
- MAZLIAK P., 1971. - Les membranes protoplasmiques. Doin ed. Paris.
- MAZLIAK P. et A. Ben ABDELKADER, 1970. - La biosynthèse des lipides dans les mitochondries végétales. *Rev. Gen. Bot.* 77 : 53-71.
- METZ D.H., 1975. - The mechanism of interferon action. *Cell* 6 : 429-439.
- MILLER H.C. et W.J. ESSELMAN, 1975. - Modulation of immune response by antigen-reactive lymphocytes after cultivation with gangliosides. *J. Immunol.* 115 : 839-843.
- MIRI R.K. et J.S. BUBAR, 1966. - Self-incompatibility as an outcrossing mechanism in birdsfoot trefoil (*Lotus corniculatus*). *Can. J. Plant Sci.* 46 : 411-418.
- MODLIBOWSKA J., 1945. - Pollen tube growth and embryosac development in apples and pears. *J. Pomol. Hort. Sci.* 45 : 57-89.

- MORELL P. et P. BRAUN, 1972. - Biosynthesis and metabolic degradation of sphingolipids not containing sialic acid. *J. Lipid Res.* 13 : 293-310.
- MRAZ W. et H. JALZKEWITZ, 1976. - Cerebroside sulphatase activity of arylsulphatase (acidic forms) from invertebrates in the absence of activators. *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* 357 : 1193-1197.
- MULLIN B.J., P.H. FISHMAN, G. LEC, S.M. ALOJ, F.D. LEDLEY, R.J. WINAND, L.D. KOHN et R.O. BRADY, 1976. - Thyrotropin-ganglioside interactions and their relationship to the structure and function of thyrotropin receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 73 : 842-846.
- NAKANISHII T., Y. ESASHI et K. HINATA, 1969. - Control of self-incompatibility by CO₂ gas in *Brassica*. *Plant Cell Physiol.* 10 : 925-927.
- NAKANISHII T. et K. HINATA, 1973. - An effective time for CO₂ gas treatment in overcoming self-incompatibility in *Brassica*. *Plant Cell Physiol.* 14 : 873-879.
- NASRALLAH M.E. et D.H. WALLACE, 1967. - Immunogenetics of self-incompatibility in *Brassica oleracea* L. *Heredity* 22 : 519-527.
- NASRALLAH M.E. et D.H. WALLACE, 1968. - The influence of modifier genes of the intensity and stability of self-incompatibility in cabbage. *Euphytica* 17 : 495-503.
- NASRALLAH M.E., J.T. BARBER et D.H. WALLACE, 1969. - Self-incompatibility proteins in plants : detection, genetics and possible mode of action. *Heredity* 24 : 23-27.
- NASRALLAH M.E., D.H. WALLACE et R.M. SAVO, 1973. - Genotype, protein, phenotype relationships in self-incompatibility of *Brassica*. *Genet. Res.* 20 : 151.
- NETTANCOURT D. de, 1972. - Self-incompatibility in basic and applied researches with higher plants. *Genetica agraria* 26 : 163-216.
- NETTANCOURT D. de, 1977. - Incompatibility in Angiosperms. Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New-York.
- NETTANCOURT D. de et W.F. GRANT, 1963. - The cytogenetics of Lotus (Leguminosae). II. A diploid interspecific Hybrid between *L. tenuis* and *L. filicaulis*. *Can. J. Genet. Cytol.* 5 : 338-347.
- NETTANCOURT D. de et R. ECOCHARD, 1968. - Effects of chronic irradiation upon a self-incompatible clone of *Lycopersicum peruvianum*. *Theoret. Appl. Genet.* 38 : 289-293.
- NETTANCOURT D. de, R. ECOCHARD, M.D.G. PERQUIN, T. van der DRIFT et M. WESTERHOF, 1971. - The generation of new S-alleles at the incompatibility locus of *L. peruvianum* Mill. *Theoret. Appl. Genet.* 41 : 120-129.
- NETTANCOURT D. de, M. DEVREUX, A. BOZZINI, M. CRESTI, E. PACINI et G. SARFATTI, 1973. - Ultrastructural aspects of self-incompatibility mechanism in *Lycopersicum peruvianum* Mill. *J. Cell Sci.* 12 : 403-419.
- NICHOLS B.W., A.T. JAMES et J. BREUER, 1967. - Interrelationships between fatty acid biosynthesis and acyl-lipid synthesis in *Chlorella vulgaris*. *Biochem. J.* 104 : 486-491.

- NICHOLSON G.L., 1974. - The interactions of lectins with animal cell surfaces. *Int. Rev. Cytol.* 39 : 89-190.
- NIEDECK B., 1975. - On the function of lecithin and lecithin substitutes in the immune reaction of galactosyl lipids. *Immunochem.* 12 : 807-812.
- OCKENDON D.J., 1974. - Distribution of self-incompatibility alleles and breeding structure of open pollinated cultivars of Brussel sprouts. *Heredity* 33 : 159-171.
- OPEKE L.K. et V.J. JACOB, 1969. - Studies on methods of overcoming self-incompatibility in *Theobroma cacao*. *Proc. 2nd Intern. Cacao Res. Conf. Bahia, Brazil* : 356-358.
- ORNDUFF R., 1964. - The breeding system of *Oxalis suksdorfii*. *Am. J. Bot.* 51 : 397-314.
- OSTAPENKO V.I., 1961. - Physiological and biochemical characteristics of pollen and pistillate tissues of certain members of the *Rosaceae*. *Soviet Plant Physiol.* 7 : 444-449.
- OVERATH P. et H. TRAUBLE, 1973. - Phase transitions in cells, membrane and lipids of *E. coli*. Detection by fluorescent probes, light scattering and dilatometry. *Biochemistry* 12 : 2625.
- PANDEY K.K., 1956. - Mutations of self-incompatibility alleles in *Trifolium pratense* and *T. repens*. *Genetics* 41 : 327-343.
- PANDEY K.K., 1957. - Genetics of incompatibility in *Physalis ixocarpa* Brot. A new system. *Am. J. Botan.* 44 : 879-887.
- PANDEY K.K., 1959. - Mutations of the self-incompatibility gene (S) and pseudo-compatibility in angiosperms. *Lloydia* 22 : 222-234.
- PANDEY K.K., 1960. - Incompatibility in *Abitulon hybridum*. *Am. J. Botan.* 47 : 877-883.
- PANDEY K.K., 1962. - Interspecific incompatibility in *Solanum* species. *Am. J. Botan.* 49 : 874-882.
- PANDEY K.K., 1965. - Centric chromosome fragments and pollen-part mutation of the incompatibility gene in *Nicotiana alata*. *Nature (Lond.)* 206 : 792-795.
- PANDEY K.K., 1967a. - Origin of genetic variability : combination of peroxidase isozymes determine multiple allelism of the S-gene. *Nature (Lond.)* 213 : 669.
- PANDEY K.K., 1967b. - Elements of the S-gene complex. II. Mutation and complementation at the SI locus in *Nicotiana alata*. *Heredity* 22 : 255-283.
- PANDEY K.K., 1969. - Elements of the S-gene complex. V. Interspecific cross-compatibility relationships and theory of the evolution of the S complex. *Genetica* 40 : 447-474.

- PANDEY K.K., 1970. - Time and site of the S-gene action, breeding systems and relationships in incompatibility. *Euphytica* 19 : 364-372.
- PANDEY K.K., 1975. - Model for incompatibility determination in flowering plants. *Incomp. Newsletter* 6 : 70-73.
- PASCHER I., 1976. - Molecular arrangements in sphingolipids conformation and H binding of cer and their implication on membrane stability and permeability. *Biochem. Biophys. Acta* 455 : 433-451.
- PICARD J. et Y. DEMARLY, 1952. - Autofertilité chez la luzerne. Son conditionnement biologique. *Proc. 6th. Intern. Grasslands Congr.* 1 : 260-266.
- PLUIJIM van der J. et H.F. LINSKENS, 1966. - Feinstruktur der Pollen-Schläuche im Griffel von *Petunia*. *Züchter* 36 : 220-224.
- PODDUBNAYA-ARNOLDI V.A., N.V. ZINGER, T.P. PETROVSKAYA et N.N. POLUNINA, 1961. - Histochemical study of the pollen grains and pollen tubes in the angiosperms. *Recent Advan. Botan.* 1 : 682-685.
- QUARLES R.H., N. CLARKE et R.M.C. DAWSON, 1968. - Isolation of N-acyl phosphatidylethanolamine from pea seeds. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 33 : 964.
- RANGASWAMY N.S. et K.R. SHIVANNA, 1967. - Induction of gametic compatibility and seed formation in axenic cultures of a diploid self-incompatible species of *Petunia*. *Nature (Lond.)* 16 : 937-939.
- RANGASWAMY N.S. et K.R. SHIVANNA, 1971. - Overcoming self-incompatibility in *Petunia axillaris* (Lam.) B.S.P. II. Placenta pollination *in vitro*. *Golden Jubilee, vol. J. Ind. Botan. Soc.* 50 A : 286-296.
- RANGASWAMY N.S. et K.R. SHIVANNA, 1972. - Overcoming self-incompatibility in *Petunia axillaris*. III. Two-site pollinations *in vitro*. *Phytomorphology* 21 : 284-289.
- RAPPORT M.M. et L. GRAF, 1969. - Immunological properties of lipids and their relation to the tumor cell. *Ann. N.Y. Acad.* 159 : 446-450.
- REICHART C.F., P.M. PAN, K.P. MATHEWS et I.J. GOLDSTEIN, 1973. - Lectin-induced blast transformation of human lymphocytes. *Nat. New. biol.* 242 : 146-148.
- RILEY H.P., 1932. - Self-sterility in Shepheds purse. *Genetics* 17 : 231-295.
- RILEY H.P., 1934 - Self-sterility and self-fertility in species of the *Genus nemesia*. *Am. J. Botan.* 22 : 889-894.
- RILEY H.P., 1936. - The genetics and physiology of self-sterility in the *Genus capsella*. *Genetics* 21 : 24-39.

- ROBBINS P.N. et T. UCHIDA, 1962. - Studies on the chemical basis of the phage conversion of O-antigens in the E-group *Salmonella*. *Biochemistry* 1 : 323-335.
- ROBERTS I.N., A.D. STEAD et H.C. DICKINSON, 1979. - No fundamental changes in lipids of the pollen grain coating of *Brassica oleracea* following either self and cross pollinations. *Incomp. Newsletter* 11 : 77-83.
- ROGGEN H.P., 1967. - Changes in enzyme activities during the progame phase in *Petunia hybrida*. *Acta Bot. Neerl.* 16 : 1-31.
- ROGGEN H.P., 1972. - Scanning electron microscopical observations on compatible and incompatible pollen-stigma interactions in *Brassica Euphytica* 21 : 1-10.
- ROGGEN H.P. et A.J. van DIJK, 1972. - Breaking incompatibility in *Brassica oleracea* L. by steel-brush pollination. *Euphytica* 21 : 48-51.
- ROGGEN H.P., A.J. van DIJK et C. DORSMAN, 1972. - "Electric aided" pollination : A method of breaking incompatibility in *Brassica oleracea* L. *Euphytica* 21 : 181-184.
- SAAD S.I., 1963. - Pollen and Spores, 5-17.
- SADAVA D. et M.J. CHRISPPEELS, 1973. - The biosynthesis and secretion of hydroxyprolin rich cell wall glycoproteins. In : "Biogenesis of plant cell wall polysaccharides, LOEWUS F. ed. : 165-174.
- SAMPSON D.R., 1960. - An hypothesis of gene interaction at the S locus in self-incompatibility systems of angiosperms. *Am. Naturalist* 94 : 283-292.
- SAMPSON D.R., 1962. - Intergeneric pollen stigma incompatibility in the *Cruciferae*. *Can. J. Genet. Cytol.* 4 : 38-49.
- SAMPSON D.R., 1967. - Frequency and distribution of self-incompatibility alleles in *Raphanus raphanistrum*. *Genetics* 56 : 241-251.
- SARFATTI G., F. CIAMPOLINI, E. PACINI et M. CRESTI, 1974. - Effects of actinomycin on *Lycopersicon peruvianum* pollen tube growth and self-incompatibility reaction. In : "Fertilization in Higher Plants", Ed. H.F. LINSKENS.
- SAWADA Y., 1958. - Physiological and morphological studies on the pollen grain ; 7- on the effects of some aminoacids on the germination of the pollen grain and on the growth of the pollen tube. *Bot. Mag.* 71 : 218-233.
- SCHLÖSSER K., 1961. - Cytologische und cytochemische Untersuchungen über das Pollenschlauch-Wachstum selbststeriler Petunien. *Z. Botan.* 49 : 266-288.
- SCOTT J., 1865. - On the individual sterility and cross-impregnation of certain species of *Oncidium*. *J. Linnean Soc. London* 8 : 163-167.
- SHARMA K.D. et J.W. BOYES, 1961. - Modified incompatibility of Buckwheat following irradiation. *Can. J. Botan.* 39 : 1241.
- SHAW G., 1971. - In : "Sporopollenin" London, Acad. Press : 305.

- SHIH C.Y. et L. RAPPAPORT, 1971. - Regulation of bud rest in tubers of potato. *Solanum tuberosum* L. VIII. Early effects of gibberellin A₃ and abscisic acid on ultrastructures. *Plant Physiol.* 48 : 31-35.
- SHIVANNA K.R., 1978. - Pollen-stigma interaction-recognition, acceptance and rejection. In : "Symposium of basic sciences and agriculture." *Proc. Ind. Nat. Sci. Acad.* : 53-61.)
- SHIVANNA K.R., 1979. - Recognition and rejection phenomena during pollen pistil interaction. *Proc. Indian Acad. Sci.* 88 : 115-141.)
- SHIVANNA K.R. et N.S. RANGASWAMY, 1969. - Overcoming self-incompatibility in *Petunia axillaris*. I. Delayed pollination, pollination with stored pollen, and bud pollination. *Phytomorphology* 19 : 372-380.
- SHIVANNA K.R. et D.C. SASTRI, 1976. - Stigma surface proteins and bud pollination in *Petunia* : a correlative study. *Incomp. Newsletter* 7 : 16-21.
- SIDDIQUI B. et S.I. HAKOMORI, 1970. - Change in glycolipid pattern in Morris hepatomas 5123 and 7800. *Cancer Res.* 30 : 2930-2936.
- SIMPSON L.L. et M.M. RAPPAPORT, 1971. - Binding of botulinum toxin to membrane lipids sphingolipids, steroids and fatty acids. *J. Neurochem.* 18 : 1751-1759.
- SINGER S.J., 1974. - The fluid mosaic model of membrane structure. *Ann. Rev. Biochem.* 43 : 805-830.
- SINGER S.J. et G. NICHOLSON, 1972. - The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science* 175 : 720-731.
- SMITH E.L., 1976. - Chromatographic methods in the determination of absolute and relative configuration of FA. *J. of Chromatographic Science* 14 : 36-40.
- SMITH E.L. et A.K. LOUGH, 1975. - Application of open tubular column/gas liquid chromatography to the analysis of complex mixtures of branched chain fatty acids. *J. of chromat. Sci.* 13 : 486-490.
- SMITH E.L., J.M. Mc KIBBIN, K.A. KARLSSON, I. PASCHER et B.E. SAMUELSSON, 1975. - Characterisation by mass spectrometry of blood group A active glycolipid from human and dog small intestine. *Biochem.* 14 : 2120.
- SNEATH P.H.A. et J. LEDERBERG, 1961. - Inhibition by periodate of mating in *E. coli* K.12. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 77 : 86-90.
- STANLEY R.G., 1964. - Physiology of pollen and pistil. *Sci. Progr.* 52 : 122-132. J
- STANLEY R.G. et H.F. LINSKENS, 1965. - Protein diffusion from germinating pollen. *Physiol. Plantarum* 18 : 47-53. J
- STEWART F.C. et R.G.S. BIDWELL, 1961. - The free nitrogen compounds in plants considered in relation to metabolism, growth and development ; amino acid pools. *Proc. Intern. Symp., Ed. J.T. HOLDEN, Amst. Elsevier* : 667-693.

- STOFFYN P., A. STOFFYN et G. HAUSER, 1973. - Structure of trihexosylceramide biosynthesised *in vivo*. *J. Biol. Chem.* 248 : 1920-1923.
- STOUT A.B., 1917. - Fertility in *Cichorium intybus* : The sporadic occurrence of self-fertile plants among the progeny of self-sterile plants. *Am. J. Botan.* 4 : 375-395.
- STRAUB J., 1947. - Zur Entwicklungsphysiologie der Selbststerilität von *Petunia*. II. Das Prinzip des Hemmungs-Mechanismus. *Z. Naturforsch.* 2b : 433-444.
- STROBEL H.N., A.Y.H. LA, J. HEIDEMA et M.Y. COON, 1970. - Phosphatidylcholine requirement in the enzymatic reduction of hemoprotein PH50 and in fatty acid, hydrocarbon and drughydroxylation. *J. Biol. Chem.* 245 : 4851.
- SUZUKI K. et Y. SUZUKI, 1970. - Globoid cell leucodistrophy (Krabbe's disease) : deficiency of galactocerebroside β galactosidase. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 66 : 302-309.
- SVENNERHOLM L., 1970. - Ganglioside metabolism. In : "Comprehensive Biochemistry, vol. 18". FLORKIN M. et E.H. STOTZ ed., Elsevier, Ams. : 201-225.
- SWEETLEY C.C. et G. DAWSON, 1969. - Determination of GSL structure by mass spectrometry. *Biochem. Biophys. res. comm.* 37 : 6-14.
- TAN Y.H., 1976. - Chromosome 21 and the cell growth inhibition effect of human interferon preparations. *Nature* 260 : 141-143.
- TARA C.P. et A.N. NAMBOODIRI, 1976. - Association between defective stigmatic exudates and sterility in *Impatiens* : chromatographic evidence. *Ind. J. Exp. Biol.* 14 : 354-358.
- THOMPSON K.F., 1972. - Competitive interaction between two-alleles in a sporophytically controlled incompatibility system. *Heredity* 28 : 1-8.
- THOMPSON K.F. et J.P. TAYLOR, 1971. - Self-compatibility in kale. *Heredity* 27 : 459-471.
- TOMKOVA J., 1959. - Problems of autosterility in *Nicotiana glauca* Link et Otto (Formation of the inhibitory factor in the pistil). *Biologia Plantarum* 1 : 328-329.
- TOWNSEND C.E., 1965. - Seasonal and temperature effects on self-compatibility in tetraploid alsike clover, *Trifolium hybridum* L. *Crop. Sci.* 5 : 329-332.
- TOWNSEND C.E., 1966. - Self-compatibility response to temperature and the inheritance of the response in tetraploid alsike clover, *Trifolium hybridum* L. *Crop. Sci.* 6 : 415-419.
- TOWNSEND C.E., 1968. - Self-compatibility studies with diploid alsike clover, *Trifolium hybridum* L. *Crop. Sci.* 8 : 269-272.

- TOWNSEND C.E., 1969. - Self-compatibility studies with diploid alsike clover, *Trifolium hybridum* L. IV. Inheritance of type II self-compatibility in different genetic backgrounds. *Crop Sci.* 9 : 443-446.
- TOWNSEND C.E., 1971. - Further studies on the inheritance of a self-compatibility response to temperature and the segregation of S-alleles in diploid alsike clover. *Crop Sci.* 11 : 860-863.
- TSINGER N.V. et P.T. PETROVSKAYA-BARANOVA, 1961. - The pollen grain wall - a living physiologically active structure. *Dokl. Akad. Nauk SSSR* 138 : 466-496.
- TUPY J., 1961. - Investigation of free amino-acids in cross-, self- and non pollinated pistils of *Nicotiana glauca*. *Biologia Plantarum* 3 : 47-64.
- TUPY J., 1962. - Radiorespirometric study of the utilization of exogenous sucrose, glucose by germinating apple pollen. *Biol. Plant.* 4 : 69-84.
- UBISCH G. von, 1921. - Zur Genetic der trimorphen Heterostylie sowie einige Bemerkungen zur dimorphen Heterostylie. *Biol. Zbl.* 41 : 88-96.
- VASIL'EV I.M., 1962. - Effects of ionizing radiations on plants. *Publishing House Acad. Sci. USSR, Moscow ; Transl. by U.S. Atom. Energy Comm.*
- VERKLEIJ A.J., R.F.A. ZWAAL, B. ROELOFSEN, P. COMFURIUS, D. KASTELIJN et L.L.M. VAN DEENEN, 1973. - The asymmetric distribution of phospholipids in the human red cell membrane. *Biochim. Biophys. Acta* 323 : 178-193.
- VICKER M.G. et D.R. CRITCHLEY, 1971. - Glycolipids as cell surface receptors and their role in cell social behaviour. *Biochem. Soc. transaction* 5 : 1695-1700.
- WARREN G.B., M.D. HOUSLAY, J.C. METCALFE J.C. et N.J. BIRDSALL, 1975. - Cholesterol is excluded from the phospholipid annulus surrounding an active calcium transport protein. *Nature* 255 : 684-687.
- WATANNABE K., T. MATSUBARA et S.I. HAKOMORI, α L fucopyranosylceramide a novel glycolipid accumulated in some of the human colon tumors. *J. Biol. Chem.* 251 : 2385-2387.
- WATKINS W.M., 1966. - Blood group substances. *Science* 152 : 172-181.
- WEBER J.M. et R.B. STEWART, 1975. - Cyclic AMP potentiation of interferon antiviral activity and effects of interferon on cyclic AMP levels *J. Gen. virol.* 28 : 363-372.
- WEINSTEIN L.H. et C.A. PORTER, 1962. - Changes in free aminoacid and amide levels of leaf pieces, detached leaves, detached plants and intact plants of tobacco at different times. *Contr. Boyce Thompson Inst.* 21 : 387-392.
- WEINSTEN D.B., J.B. MARSH, M.C. GLICK et L. WARREN, 1970. - Membranes of animal cells. II. The glycolipids of the L cell and its surface membrane. *J. Biol. Chem.* 245 : 3928-3937.

- WHITEHOUSE H.L.K., 1950. - Multiple-allelomorph incompatibility of pollen and style in the evolution of the angiosperms. *Ann. Botan. New Series* 14 : 198-216.
- WIEGANDT H., 1971. - Glycosphingolipids. *Adv. Lip. res.* 9 : 249-289.
- WILLIAMS W., 1947. - Genetics of red clover (*Trifolium pratense* L.) compatibility. III. *J. Genet.* 48 : 69-79.
- WILLIAMS W., 1964. - General principles and plant breeding. Blackwell Oxford, 504.
- WILLING R.R. et L.D. PRYOR, 1976. - Interspecific hybridation in poplar. *Theoret. Appl. Genet.* 47 : 141-151.
- WILLINGHAM M.C., 1976. - Cyclic AMP and cell behaviour in cultured cells. *Int. Rev. Cytol.* 44 : 319-363.
- WINTON D. de et J.B.C. HALDANE, 1933. - The genetics of *Primula sinensis*. II. Segregation and interaction of factors in the diploid. *J. Genet.* 27 : 1-44.
- WOJCJAK L., 1974. - Effect of fatty acids and acyl CoA on the permeability of mitochondrial membranes to monovalent cations. *Febs Lett.* 44 : 25-30.
- WRICKE G., 1974. - Seed set in rye after selfing under high temperature conditions. *Incomp. Newslett. Assoc. EURATOM-ITAL, Wageningen* 4 : 23-27.
- YASUDA S., 1934. - Physiological research on self-incompatibility in *Petunia violacea*. *Bull. Coll. Agric. For. Morioka* 20 : 1.
- YASUNOBU C., 1959. - In : "Pigment cell biology". Acad. Press. New-York.
- YEN P.H. et C.E. BALLOU, 1974. - Structure and immunochemistry of Hansenula wingei Y-2340 mannan. *Biochemistry* 13 : 2420-2427.
- YOGESWARAN G., J.R. WHERETT, S. CHATTERJEE et R.R. MURRAY, 1970. - Partial characterization and demonstration of ¹⁴C glucosamine incorporation. *J. Biol. Chem.* 245 : 6718-6725.
- YOGESWARAN G., R. SHEININ, J.R. WHERETT et R.R. MURRAY, 1972. - Studies on the glycosphingolipids of normal and virally transformed 3T3 mouse fibroblasts. *J. Biol. Chem.* 247 : 5146-5148.
- ZALC B., P. DUPONEY, M.J. COULON-MORELEC et N.A. BAUMAN, 1979. - Immunogenic properties of glucosylceramides. *Mol. Immunol.* 16 : 297-300.
- ZENKTELER M., 1967. - Test-tube fertilization of ovules in *Melandrium album* Mill. with pollen grains of several species of the *Caryophyllaceae* family. *Experientia* 23 : 775-777.
- ZENKTELER M., 1970. - Test-tube fertilization of ovules in *Melandrium album* Mill. with pollen grains of *Datura stramonium* L. *Experientia* 26 : 661-662.
- ZENKTELER M., 1973. - Test-tube fertilization and obtaining interspecific and intergeneric embryos. *Abst. Eucarpia meeting, Leeds (summary)*. In : "Aseptic Culture Methods in Plant Breeding".

MOTS CLES

Oenothera missouriensis; Onagracées ; protéines ; lipides ; pollen style ; glycosphingolipides ; sulfatides ; phospholipides ; auto-incompatibilité.

RESUME :

Notre travail consiste, dans une première partie, en une mise au point bibliographique sur le phénomène d'auto-incompatibilité de fécondation. Puis nous exposons nos résultats sur l'identification et l'analyse des protéines de structure et enzymatiques ainsi que des lipides du pollen et des pistils chez *Oenothera missouriensis* Sims, espèce présentant l'auto-incompatibilité gamétophytique.

Le bilan des perturbations métaboliques qui accompagnent la pollinisation permet de dégager les conclusions suivantes :

1) Le phénomène de rejet du pollen incompatible dépend d'un processus actif, consommateur d'énergie.

2) Le métabolisme protéique est impliqué par une évolution caractéristique des acides aminés libres et par la production d'une protéine nouvelle en xénopollinisation qui semble absente ou dégradée en autopollinisation.

3) Les glycanes hydrolases ont des activités dépendantes de la réaction d'incompatibilité.

4) Le phosphatidylinositol est spécifique du pollen alors que le phosphatidylglycérol caractérise le style. La pollinisation des styles est accompagnée par des variations des teneurs et des structures des constituants des phospho et des glycosphingolipides. La modification de structure des acides gras et des bases à longue chaîne des GSL en fonction de l'inhibition de croissance du tube pollinique apparaît être en relation avec la diminution de la perméabilité membranaire des styles, facteur limitant les échanges entre le tube pollinique et le tissu conducteur. Ce résultat conduit à proposer un schéma fondé sur une modélisation physicochimique se substituant au modèle physiologique ce qui devrait conduire à une meilleure compréhension du processus d'incompatibilité.